

EXPRESSIONSANALYSE  
VON PROLIFERATIONS-REGULATORISCH WIRKSAMEN  
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN  
DES MAP-KINASE- und PI3K-/AKT-SIGNALWEGES  
IN PRIMÄREN HIRNTUMOREN

**Dissertation**  
**zur Erlangung des akademischen Grades**

**„doctor medicinae“**  
**(Dr. med.)**

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

**von Stephanie May**  
**geboren am 20.09.1989 in Freiberg**

Gutachter

1. ....

2. ....

3. ....

Tag der öffentlichen Verteidigung: .....

## **Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
Abb.	Abbildung
Akt	entspricht Proteinkinase B
Anti-pan Ras	Antikörper gegen Ras
Anti-Raf-B	Antikörper gegen Raf-B
Anti-p-Erk1/2	Antikörper gegen Erk
Anti-Akt	Antikörper gegen Akt
Anti-mTor	Antikörper gegen mTor
Anti-phospho-mTor	Antikörper gegen p-mTor
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-assoziiertes death promoter
Bcl-2	B-Cell lymphoma-2
CDK4	Cyclin-Dependent Kinase 4
c-fos	zellulärer FBJ-Mäuseosteosarkom-Transkriptionsfaktor
c-jun	zellulärer Vogelvirus-Sarkom 17-Transkriptionsfaktor
c-myc	zellulärer Myelozytomatose-Transkriptionsfaktor
DAB+-Lösung	Diaminobenzidinlösung
DEEB	Duale-Endogene-Enzym-Blockierungslösung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dp-Erk	zweifach phosphoryliertes Erk
E2F	E2-Promotor Binding Factor-Transkriptionsfaktor
EGF	Epidermal Growth Factor
EGF-R	Epidermal Growth Factor-Rezeptor
EGFRvIII	mutierte Form des Epidermal Growth Factor-Rezeptors
Erk1/2	Extrazellulär-Signal regulierten Kinasen 1 und 2
Ets-1	E twenty six-1- Transkriptionsfaktor
GABA <sub>A</sub> -R	Gamma-Amino-Buttersäure-Rezeptor A
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Grb-2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK-3	Glycogen-Synthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat

HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/neu
HIER-Demaskierung	Hitzeinduzierte Epitop Retrieval-Demaskierung
HRP	Horseradish Peroxidase
IDH1	Isocitrat-Dehydrogenase 1
IGF-2	Insulin-like Growth Factor-2
IGFBP2	Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 2
KSR	Kinase Suppressor of Ras
LOH	Lost of heterozygosity
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEK-1	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase/ERK-Kinase-1
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mTor	mammalian Target of Rapamycin
mTorC1	mammalian Target of Rapamycin Komplex 1
mTorC2	mammalian Target of Rapamycin Komplex 2
NF1	Neurofibromatose 1
NF2	Neurofibromatose 2
NFκB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
p14 <sup>ARF</sup>	Tumorsuppressor p14 <sup>ARF</sup>
p16 <sup>INK4A</sup>	Tumorsuppressor p16 <sup>INK4A</sup>
p53	Tumorsuppressor p53
pAkt	aktivierte, phosphorylierte Form von Akt
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDGF-R	Platelet-derived Growth Factor-Rezeptor
PDK1	Phosphoinositide dependent Protein-Kinase-1
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten -Tumorsuppressor
PKB	Protein-Kinase B = Akt
PKC	Protein-Kinase C
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat-Kinase

PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase Catalytic Subunit Alpha
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat
phospho-mTor/p-mTor	aktivierte, phosphorylierte Form von mTor
Ras	G-Protein, dessen 1. Entdeckung im <u>Ratten-Sarcom</u> -Virus
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma oder Rat Fibrosarcoma
Raptor	Regulatory assoziated protein of mTor
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTor
Rb-Gen	Retinoblastom-Gen
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rho1	Ras homolog-1
RNA	Ribonukleinsäure
RKIP	Raf-Kinase Inhibitory Protein
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
S6K1	ribosomale Protein S6-Kinase beta-1
SH-2-Domänen	Src-Homology-Typ2-Domänen
SOS	Son of Sevenless
S-/T-Kinase	Serin-/Threonin-Kinase
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TIF-IA	Transcriptional Intermediary Factor 1 Alpha
TGF- $\alpha$	Transforming Growth Factor $\alpha$
TSC1/2	Tuberin Sclerosis Complex
UBF	Upstream Binding Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WHO	World Health Organization

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

## Zusammenfassung

### 1. Einleitung

1.1. <u>Signaltransduktionswege</u> .....	1
1.1.1. <i>Der MAP-Kinase-Signalweg</i> .....	1
1.1.2. <i>Der PI3K-/Akt-Signalweg</i> .....	5
1.2. <u>Autonomes Zellwachstum (Tumorigenese)</u> .....	8
1.2.1. <i>Voraussetzung für die Tumorentstehung</i> .....	9
1.2.2. <i>Unabhängigkeit von Wachstumssignalen</i> .....	10
1.2.3. <i>Fehlende Reaktion auf externe Anti-Wachstumssignale</i> .....	11
1.2.4. <i>Umgehung der Apoptose</i> .....	11
1.2.5. <i>Unbegrenztes replikatives Potential</i> .....	12
1.2.6. <i>Eigenständige Neoangiogenese und Entdifferenzierung der Tumorzellen</i> .....	13
1.2.7. <i>Gewebeinvasion und Metastasierung</i> .....	13
1.3. <u>Signalwegveränderungen in Hirntumoren</u> .....	14
1.3.1. <i>Typische chromosomale und genetische Veränderungen von Meningeomen</i> .....	14
1.3.1.1. <i>Der MAP-Kinase-Signalweg in Meningeomen</i> .....	15
1.3.1.2. <i>Beeinflussung des PI3K-/Akt-Signalweges in Meningeomen</i> .....	16
1.3.2. <i>Typische molekulare und genetische Veränderungen in pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I)</i> .....	17
1.3.2.1. <i>Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges in pilozytischen Astrozytomen</i> .....	18
1.3.2.2. <i>Der PI3K-/Akt-Signalweg in pilozytischen Astrozytomen</i> .....	19
1.3.3. <i>Charakteristische Veränderungen diffuser Astrozytome (WHO Grad II)</i> .....	19
1.3.3.1. <i>MAP-Kinase-Signalwegveränderungen in diffusen Astrozytomen</i> ...	20
1.3.3.2. <i>Veränderungen des PI3K-/Akt-Signalweges in diffusen Astrozytomen</i> .....	20

1.3.4. Molekulare und genetische Besonderheiten anaplastischer Astrozytome (WHO Grad III).....	20
1.3.4.1. Bedeutung des MAP-Kinase-Signalweges in anaplastischen Astrozytomen.....	21
1.3.4.2. Die PI3K-/Akt-Signalkaskade in anaplastischen Astrozytomen.....	22
1.3.5. Molekulare und genetische Merkmale von Glioblastomen (WHO Grad IV)...	22
1.3.5.1. Primäre Glioblastome.....	22
1.3.5.2. Sekundäre Glioblastome.....	23
1.3.5.3. Veränderungen des MAP-Kinase und PI3K-/Akt- Signalweges in Glioblastomen.....	24
<b>2. Fragestellung und Ziele der Arbeit</b>	
<b>3. Methodik</b>	
3.1. <u>Materialien</u> .....	28
3.1.1. Gewebeproben.....	28
3.1.2. Materialien.....	29
3.1.3. Geräte.....	31
3.2. <u>Methoden</u> .....	32
3.2.1. Herstellen der Schnittpräparate.....	32
3.2.2. Entparaffinieren der Gewebeschnitte.....	33
3.2.3. Die immunhistochemische Färbung.....	33
3.2.3.1. Herstellen der Pufferlösungen.....	34
3.2.3.2. Immunhistochemische Färbung mit Peroxidase/DAB+.....	34
3.2.3.2.1. Biochemischer Hintergrund.....	34
3.2.3.2.2. Hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung und Duale-Endogene-Enzym-Blockierung.....	36
3.2.3.2.3. Inkubation mit dem primären Antikörper.....	37
3.2.3.2.4. Inkubation mit dem sekundären Antikörper und Farbreaktion.....	37
3.2.3.2.5. Die Hämatoxylin Färbung.....	38
3.2.3.3. Die immunhistochemische Färbung mit Streptavidin/ Alkalische Phosphatase.....	38
3.2.3.3.1. Biochemischer Hintergrund.....	38
3.2.3.3.2. Durchführung der immunhistochemische Färbung.....	39
3.3. <u>Mikroskopische und statistische Auswertung</u> .....	40

## 4. Ergebnisse

4.1. <u>Mikroskopische Analyse der Tumorgewebe</u> .....	42
4.1.1. <i>Mikroskopische und statistische Analyseergebnisse der Anti-pan Ras-AK Färbung</i> .....	43
4.1.2. <i>Die Analyseergebnisse der Färbung mit Anti-Raf-B-Antikörper</i> .....	47
4.1.3. <i>Analyseresultate der Anti-p-Erk1/2-AK Färbung</i> .....	53
4.1.4. <i>Mikroskopische und statistische Analyseergebnisse der Färbung mit Anti-Akt-AK</i> .....	58
4.1.5. <i>Auswertungsergebnisse der Färbung mit Anti-mTor-AK</i> .....	63
4.1.6. <i>Die Auswertungsergebnisse der Anti-phospho-mTor-AK Färbung</i> .....	68
4.2. <u>Zusammenfassung der Farbreaktionen der verschiedenen Antikörper</u> .....	73

## 5. Diskussion

5.1. <u>Bewertung der Untersuchungsmethode und des Analyseverfahrens</u> .....	76
5.1.1. <i>Die immunhistochemische Färbung</i> .....	76
5.1.2. <i>Die lichtmikroskopische Analyse der Farbergebnisse</i> .....	77
5.2. <u>Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung in Meningeomen</u> .....	78
5.2.1. <i>Initiationsrelevanz des MAP-Kinase-Signalweges in Meningeomen</i> .....	78
5.2.2. <i>Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges in Meningeomen mit möglichen Tendenzen</i> .....	81
5.3. <u>Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung in Gliomen</u> .....	83
5.3.1. <i>Relevanz des MAP-Kinase-Signalweges in pilozytischen Astrozytomen und Hinweise bezüglich seiner Progressionsrelevanz in infiltrierenden Gliomen</i> .....	83
5.3.2. <i>Der PI3K-/Akt-Signalweg nimmt Anteil an der Pathogenese mancher, aber nicht aller Gliome</i> .....	87

## 6. Schlussfolgerung

### Literatur- und Quellenverzeichnis

### Anhang

### Danksagung

### Ehrenwörtliche Erklärung



## Zusammenfassung

Der Mitogen-aktivierte Protein-Kinase- (MAP-Kinase-) Signalweg und Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase- (PI3K-)/Akt-Signalweg wurden in jüngster Vergangenheit in zahlreichen Studien als die relevantesten onkogenen Signalwege für primäre Hirntumoren beschrieben. Beide Signalkaskaden sind entscheidend für das Zellüberleben. So steuert der MAP-Kinase-Signalweg elementare Funktionen wie Proliferation und Differenzierung, beeinflusst die Wachstumsregulation der Zelle und reguliert die Aktivität apoptoserelevanter Proteine, während der PI3K-/Akt-Signalweg die Zellzyklusprogression steuert und darüber das Zellüberleben und Wachstum vermittelt; sowie zusätzlich ebenfalls antiapoptotische Effekte zeigt.

Die Bestimmung relevanter Schlüsselmoleküle zellzyklusregulatorischer Signalwege und deren medikamentöse Beeinflussung lieferten in der Vergangenheit einen essentiellen Beitrag zur zielgerichteten Therapie diverser Tumore. Bis heute gibt es jedoch nur wenige *in situ*-Studien, die das Expressionsverhalten relevanter Moleküle des MAP-Kinase- und PI3K-/Akt-Signalweges und deren Korrelation mit dem histologischen Grad der Hirntumore als Grundlage für die künftige Entwicklung gezielter immunologischer Therapiestrategien beschreiben.

Mit dieser Arbeit rückten die beiden Signalkaskaden wiederum in den Fokus der Betrachtung. Mittels immunhistochemischer Färbung mit spezifischen Antikörpern sollte das Expressionsmuster der MAPK- und PI3K-/Akt-Schlüsselproteine, pan Ras, Raf-B, p-Erk1/2, Akt, mTor und p-mTor, sowie deren Beziehung zum Malignitätsgrad des jeweiligen Tumors dargestellt werden, um damit einen umfassenderen Überblick über die Rolle eben dieser Signalwege in primären Hirntumoren zu gewinnen. Dazu erfolgte die immunhistochemische Färbung von 27 Meningeomen und 52 Astrozytomen aller Malignitätsgrade. Die untersuchten Proteine pan Ras, Raf-B, p-Erk1/2 und Akt zeigten nach entsprechender Färbung mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper und DAB+-Farbsubstrat einen braunen Farbumschlag. Für die Detektion von mTor und phospho-mTor wählten wir biotinylierte Antikörper, die mittels Streptavidinkonjugierter alkalischer Phosphatase nach Farbsubstratzugabe einen roten Farbumschlag zeigten. Der im Anschluss an die immunhistochemische Färbung makro- und mikroskopisch sichtbare Farbumschlag wurde von uns lichtmikroskopisch qualitativ hinsichtlich der Lokalisation und quantitativ bezüglich der Intensität der

Färbung ausgewertet. Es war uns im Rahmen dieser semiquantitativen Auswertung möglich, den Färbeergebnissen der Präparate Zahlenwerte von negativ (0), schwach (1), moderat (2) und stark (3) für die entsprechende Farbstärke zuzuordnen. Die statistische Auswertung der lichtmikroskopisch erhobenen Daten erfolgte mittels Chi<sup>2</sup>-Test, Kruskal-Wallis-Test und bei Signifikanz des letzteren mittels Mann-Whitney-Test (=U-Test). Für eine Wertung als signifikanter Unterschied musste der ermittelte Wert unter der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,05$  liegen.

Nach Auswertung der Ergebnisse zeigte sich für den MAP-Kinase-Signalweg in Meningeomen eine, statistisch nicht zu sichernde, Initiationsrelevanz. Für ein Signalprotein, p-Erk1/2, ließ sich dabei statistisch signifikant eine stärkere Expression in WHO Grad II als in WHO Grad III zeigen. Für den PI3K-/Akt-Signalweg ergab sich in Meningeomen eine mögliche Progressionsrelevanz mit einer verstärkten Aktivierung der Proteine in höheren WHO-Graden unter Verminderung der Gesamtproteinlevel. Auch für Gliome konnte die Relevanz beider Signalwege belegt werden. Die pilozytischen Astrozytome zeigten eine deutliche Expression der Signalproteine. In infiltrierenden Gliomen WHO Grad II bis IV ergaben sich für den MAP-Kinase-Signalweg Hinweise auf eine Progressionsrelevanz, die sich für Raf-B signifikant belegen ließ. Die untersuchten Moleküle des PI3K-/Akt-Signalweges waren in infiltrierenden Gliomen exprimiert ohne dass sich eindeutige Tendenzen für eine Initiations- oder Progressionsrelevanz ergaben.

Man kann festhalten, dass beide Signalwege in primären Hirntumoren eine essentielle Rolle spielen. In den verschiedenen Tumortypen zeigten sich unterschiedliche Tendenzen hinsichtlich Initiations- und Progressionsrelevanz; eine Verallgemeinerung dieser Tendenzen lässt sich jedoch nicht treffen.

Die Erkenntnisse der Relevanz des MAP-Kinase- und PI3K-/Akt-Signalweges gilt es in weiterführenden Studien zu vertiefen, um deren genaue Bedeutung in Hirntumoren zu verstehen. Mit einer detaillierteren Vorstellung der molekularen Grundausstattung ergibt sich die Möglichkeit, diese für die Diagnostik, Anpassung der Grading-Systeme, Entwicklung gezielter Therapiestrategien und Auswahl geeigneter Patienten für Studien und Therapien zu nutzen. Dies hat es bereits bei anderen humanen Tumoren ermöglicht, den betroffenen Patienten effektivere Therapieoptionen zur Lebensverlängerung, eventuell bis hin zur Heilung, anbieten zu können.

*„Menschliche Krankheiten sind ein demütigender Lehrer,  
aber die von ihnen gelehrtten Lektionen werden letzten Endes zu einer verbesserten  
Tumorthherapie und neuen Einsichten [...] in die Tumorbilogie führen*

*- wenn wir aufmerksame Schüler sind.“*

*- R.T. Abrahams and J.J. Gibbons 2007 -*

# 1. Einleitung

## 1.1. Signaltransduktionswege

Die Kommunikation zwischen Zellen wird durch chemische Verbindungen, die als extrazelluläre Botenstoffe oder Hormone bekannt sind, geführt. Diese wirken nur in Zellen mit entsprechenden Rezeptorproteinen. Nach der Bindung der humoralen Botenstoffe, die in diesem Fall Liganden genannt werden, an ihren spezifischen Rezeptor wird dieser auf verschiedene Arten aktiviert und setzt so eine Kaskade intrazellulärer Ereignisse in Gang, die als Signaltransduktionskaskade bekannt ist. Über diese Signalkaskade entwickelt die Zelle eine spezifische Antwort auf das eingehende Signal (Löffler und Petrides 2002).

Signalübertragungswege geben den Zellen gezielt die Möglichkeit auf externe Stimuli zu reagieren (Müller-Esterl et al. 2004). Infolge der Signaltransduktion kommt es zur Gentranskription durch spezifische Transkriptionsfaktoren, was eine Änderung der Genexpression bewirken kann. Über die Regulation des Zellzyklus nehmen Signaltransduktionswege somit Einfluss auf Wachstum und Proliferation der jeweiligen Zellen (Löffler und Petrides 2002).

Die Spezifität und Selektivität der intrazellulären Signalwege beruht auf der gezielten Verknüpfung komplexer Proteinnetzwerke, die ankommende Signale aufnehmen, verbinden und verteilen, um dann wieder in ihre Einzelkomponenten zu zerfallen (Müller-Esterl et al. 2004). Im Folgenden werden zwei dieser Signalkaskaden, die eine besondere Bedeutung für die zelluläre Proliferation und Differenzierung haben, näher betrachtet, der Mitogen-aktivierte Protein-Kinase- (MAP-Kinase-) und der Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat-Kinase- (PI3K-)/Akt-Signalweg (Abb. 1 und 2).

### **1.1.1. Der MAP-Kinase-Signalweg**

Der Mitogen-aktivierte Protein-Kinase- (MAP-Kinase) Signalweg nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation der Zellfunktion ein. Er steuert elementare Funktionen wie Proliferation und Differenzierung (Müller-Esterl et al. 2004), beeinflusst zusammen mit dem Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat-Kinase-(PI3K-)/Akt-Signalweg die Wachstumsregulation der Zelle und reguliert und hemmt die Aktivität von Proteinen, die in die Apoptosekaskade involviert sind (McCubrey et al. 2007).

Die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges erfolgt über transmembranäre Rezeptortyrosinkinase- (RTK-) Rezeptoren. Verschiedene Zellen des Körpers setzen lokal wirkende Faktoren frei, die als Zytokine bezeichnet werden. Zu diesen gehören Wachstumsfaktoren wie der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Löffler und Petrides 2002). Diese Liganden binden an ihren spezifischen Rezeptor, wodurch es zur Rezeptordimerisierung und zur wechselseitigen Phosphorylierung von Tyrosinkinaseresten der zytoplasmatischen Kinasedomänen kommt, was als Autophosphorylierung bezeichnet wird. Tyrosinphosphate außerhalb der katalytischen Domäne dienen der Rekrutierung von Signalübertragungs- und Adapterproteinen, den sogenannten Src-Homology-Typ2-Domänen (SH-2-Domänen). Ankerdomänen vom SH-2-Typ finden sich in zahlreichen Signalproteinen, so auch im Growth factor receptor-bound Protein 2 (Grb-2), das an den aktivierten Rezeptor bindet (Müller-Esterl et al. 2004). Das Grb-2-Protein bringt den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Son of Sevenless (SOS) zum Rezeptor, der mit diesem einen stabilen Komplex bildet. Durch SOS wird an Ras-gebundenes Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) phosphoryliert, was zur Aktivierung des Ras-Proteins führt (Kapoor und O'Rourke 2003).

Ras ist ein kleines monomeres Guaninnukleotid-bindendes Protein (G-Protein), welches zum ersten Mal im Ratten-Sarcom-Virus entdeckt wurde und daher seinen Namen trägt (Müller-Esterl et al. 2004). Es ist das gemeinsame übergeordnete Molekül zahlreicher Signalwege, wie beispielsweise des MAP-Kinase- oder auch des PI3K-/Akt-Signalweges. Insgesamt gibt es vier Ras-Proteine, Ha-Ras, N-Ras, Ki-Ras4A und Ki-Ras4B, die ein unterschiedliches aktivierendes Potential besitzen: So ist Ki-Ras ein stärkerer Aktivator der MAP-Kinase-Kaskade als Ha-Ras, welches wiederum den PI3K-/Akt-Signalweg stärker reguliert. Bevor Ras aktiviert werden kann, muss es an die Zellmembran rekrutiert werden, was abhängig von der Ras-Isoform durch posttranslationale Farnesylierung oder Geranylgeranylisierung geschieht. Aktiviertes Ras rekrutiert schließlich die Serin-/Threonin-Kinase (S-/T-Kinase) Raf zur Zellmembran (McCubrey et al. 2007).

Die Rapidly Accelerated Fibrosarcoma oder Rat Fibrosarcoma-(Raf-) Genfamilie des Menschen besteht aus A-Raf, B-Raf und Raf-1. Ursprünglich bestand die Annahme, dass Raf-1 die wichtigste Raf-Isoform sei. Heute weiß man, dass B-Raf ein stärkerer

Aktivator des MAP-Kinase-Signalweges ist als Raf-1 oder A-Raf. Raf-1 spielt für den Signalweg dennoch eine wichtige Rolle, da B-Raf teilweise durch Raf-1 aktiviert werden muss. Die Rolle der schwächsten Raf-Kinase, A-Raf, für die Zellproliferation ist heute noch weitgehend unklar.

Nachdem Raf durch Ras an die Zellmembran rekrutiert wurde, kommt es zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung verschiedener Raf-Domänen unter anderem mit Hilfe der Protein-Kinase C (PKC). In Folge dessen dissoziieren inhibitorische Proteine von Raf, beispielsweise das Raf-Kinase Inhibitory Protein (RKIP) und das Chaperon 14-3-3, und binden Gerüstkomplexe wie der Kinase Suppressor of Ras (KSR) an Raf, das in einen aktiven Zustand übergeht (McCubrey et al. 2007).

Die aktivierte Raf-Kinase phosphoryliert nun die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase/ERK-Kinase-1 (MEK-1) an Serinresten im katalytischen Zentrum. Bei MEK-1 handelt es sich um eine Tyrosin und Serin-/Threonin-dual spezifische Protein-Kinase, die sowohl Tyrosin-, als auch Threoninreste über Adenosintriphosphat- (ATP-) Verbrauch phosphoryliert (Müller-Esterl et al. 2004). Auf diese Art und Weise kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der Extrazellulär-Signal regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2), die auch als MAP-Kinasen bezeichnet werden und namensgebend für den beschriebenen Signalweg sind. Diese prolangerichteten S-/T-Kinasen werden zur Aktivierung vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert, wobei Integrinen bei diesem Transport eine besondere Bedeutung zukommt (Velpula et al. 2012).

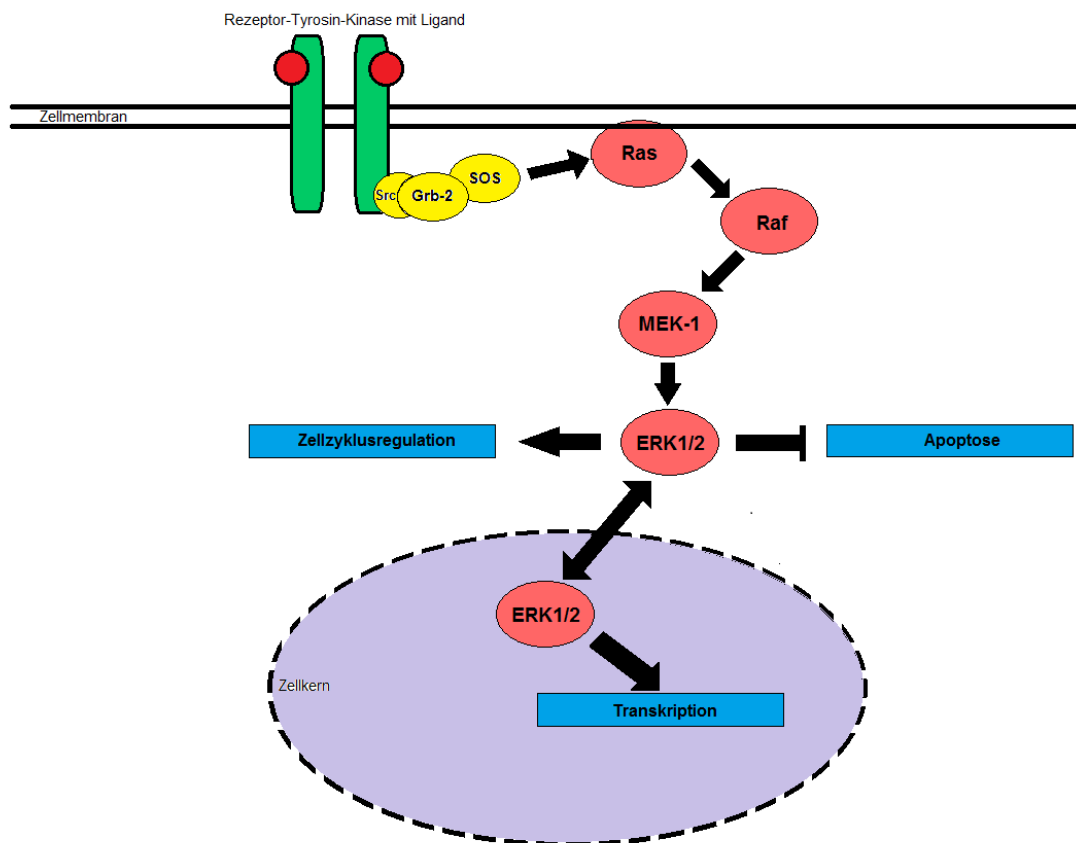
ERK1/2 selbst haben weit mehr als 160 untergeordnete Ziele, wobei die beiden Kinasen unterschiedlich reguliert werden und verschiedene Endpunkte anstreben: Während ERK2 positiv mit proliferativen Ereignissen assoziiert ist und damit pro-proliferativ wirkt, zeigt ERK1 in manchen Zellen einen inhibierenden Effekt auf ERK2 und wirkt damit wiederum antiproliferativ.

Insgesamt zeigen die ERK-Kinasen sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Effekte. Sie ändern die Expression zahlreicher apoptoseregulierender zytoplasmatischer und mitochondrialer Moleküle wie die des B-Cell lymphoma-2- (Bcl-2) Proteins, des Bcl-2-assoziierten death promotor- (BAD) Proteins und der Caspase 9, woraus ein hemmender Effekt auf die Apoptose resultiert (McCubrey et al. 2007).

Als Hauptangriffspunkt der ERK1/2-Kinasen kann man die nukleären Transkriptionsfaktoren sehen, die von den beiden Kinasen direkt oder indirekt phosphoryliert

werden und damit zur Aktivierung wachstumsinduzierender Gene führen (Kapoor und O'Rourke 2003). Zu nennen wären beispielsweise die direkte Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors E twenty six-1 (Ets-1), sowie der zellulären Transkriptionsfaktoren FBJ-Mäuseosteosarkom, Vogelvirus-Sarkom 17 und Myelozytomatose (c-fos, c-jun, c-myc), die als Aktivatoren der Proliferation, Hemmer der abschließenden Differenzierung und als Initiatoren der Apoptose agieren (McCubrey et al. 2007, Riede et al. 2004, Wong et al. 2007).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass über die MAP-Kinase-Signalkaskade kurzlebige Ras-Signale in eine mittelfristige Genexpression übersetzt werden, die letztendlich eine dauerhafte Veränderung in der Zellaktivität bewirkt (Müller-Esterl et al. 2004). Einen Überblick über den MAP-Kinase- Signalweg gibt Abb. 1.



**Abb. 1 Der MAP-Kinase-Signalweg modifiziert nach (Blenis 2002, Blenis 2003)**

Die Abbildung zeigt die Verknüpfung der Bestandteile des MAP-Kinase-Signalweges. Nach Rezeptordimerisierung infolge von Ligandenbindung rekrutiert der Komplex aus SH-2 und Grb-2 den Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor SOS zum Rezeptor. Dieser aktiviert das G-Protein Ras, welches die Kaskade aus Aktivierung von Raf, MEK-1 und ERK1/2 in Gang setzt. ERK1/2 haben zahlreiche zytoplasmatische und nukleäre Funktionen, für deren Ausübung sie in den Zellkern transloziert werden müssen. So kommt es über den Signalweg zur Regulation des Zellzyklus, des Wachstums via Transkriptionsfaktoraktivierung und zur Hemmung der Apoptose.

### 1.1.2. Der PI3K-/Akt-Signalweg

Auch der PI3K-/Akt-Signalweg besitzt elementare Funktionen in der Regulation der Zellfunktion. Er reguliert die Zellzyklusprogression und vermittelt darüber das Zellüberleben und Wachstum. Zudem zeigt er, wie auch der MAP-Kinase-Signalweg, antiapoptotische Effekte (McCubrey et al. 2007, Wong et al. 2007).

Die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges erfolgt über Anregung von RTKs infolge von Ligandenbindung, beispielsweise der Bindung des Epidermal Growth Factors (EGF) oder des Transforming Growth Factors  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) an ihren spezifischen Rezeptor, den Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGF-R). Analog zum MAP-Kinase-Signalweg kommt es zur Rezeptordimerisierung und Aktivierung durch Autophosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors (Silbernagl und Lang 2009).

Die Rezeptoraktivierung kann über zwei Wege das erste Molekül des Signalweges anregen: Durch direkte Phosphorylierung eines Tyrosinrestes am Rezeptor bildet sich eine Andockstelle für die regulatorische p85-Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase (PI3K). Diese regulatorische p85-Untereinheit von PI3K ist das Substrat zahlreicher RTKs, wie beispielsweise des EGF-Rs oder des PDGF-Rs (Wong et al. 2007). Nach Bindung von der p85-Untereinheit an den Rezeptor wird auch die katalytische p110-Untereinheit der PI3-Kinase an die RTK gebunden.

Der zweite Weg der Rekrutierung und Aktivierung von PI3K erfolgt indirekt über das Ras-Protein. Wie bereits beim MAP-Kinase-Signalweg folgt auf die Rezeptoraktivierung die Rekrutierung von SH-2-Domänen, an die wiederum das Grb-2-Protein bindet. Dieses bindet den Austauschfaktor SOS, der über den Austausch von GDP zu GTP die Ras-Aktivierung initiiert. Das aktivierte Ras-Protein leitet die Membrantranslokation von PI3K ein und aktiviert dessen katalytische Untereinheit p110 (McCubrey et al. 2007).

Die aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert das membranständige Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP<sub>3</sub>), was zur Membrantranslokation verschiedener Signalproteine führt. Zu diesen gehören die Phosphoinositide dependent Protein-Kinase-1 (PDK1) und Akt (Kapoor und O'Rourke 2003). Akt, eine auch als Protein-Kinase B (PKB) bekannte S-/T-Kinase (Wong et al. 2007), ist der zentrale Effektor von Zellwachstum, -überleben und der bioenergetischen Signalübertragung der PI3K-Kaskade. Durch PDK1 und den



mammalian Target of Rapamycin Komplex 2 (mTorC2), der aus mTor und seiner regulatorischen Untereinheit Rapamycin-insensitive companion of mTor (Rictor) besteht, erfolgt die Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 und Serin 473. Dies führt schließlich zur Aktivierung von Akt (Abraham und Gibbons 2007, McCubrey et al. 2007).

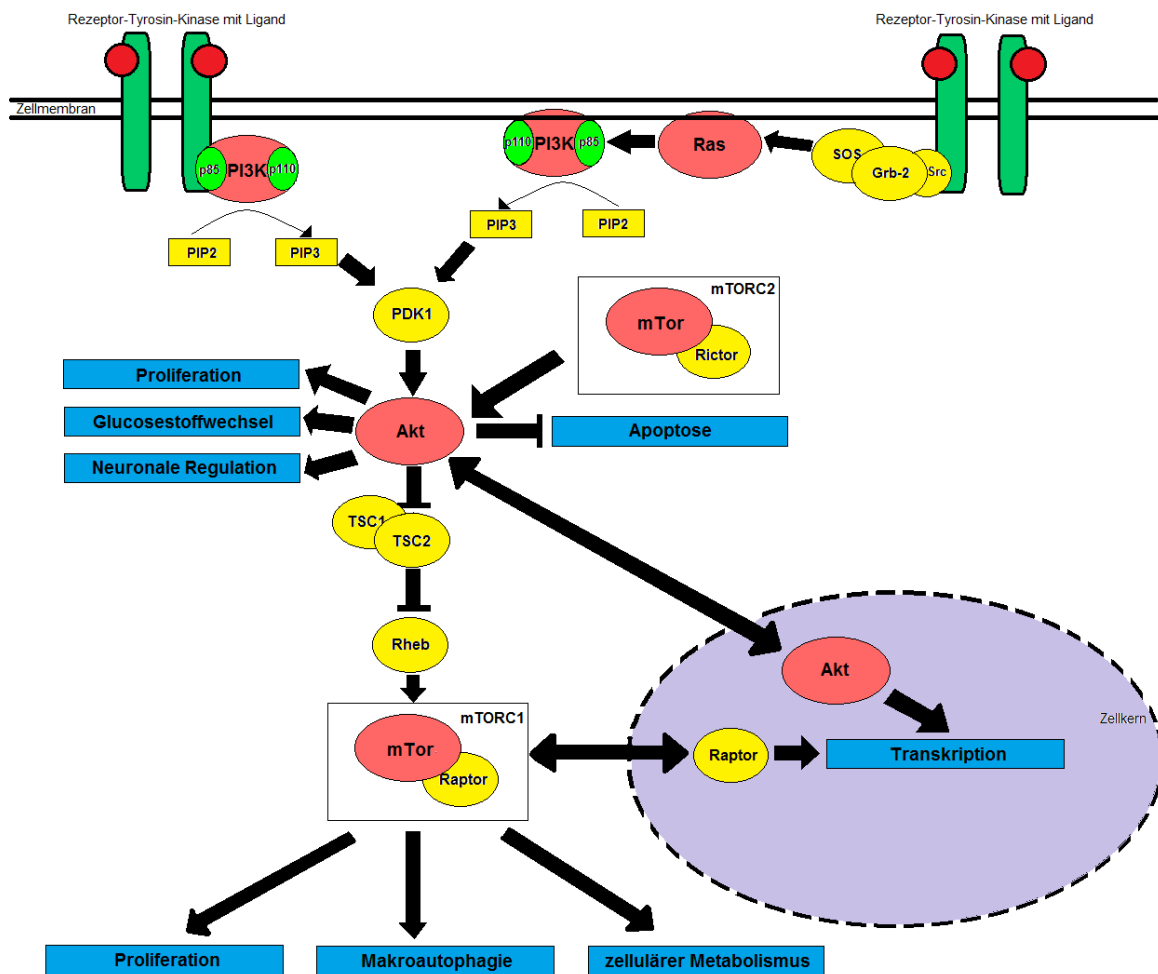
Die Akt-Aktivierung resultiert in der Anregung zahlreicher untergeordneter Substrate, sodass Akt Einfluss auf viele elementare Zellfunktionen nimmt. Es hemmt die Apoptose über die Regulation pro- und antiapoptotischer Moleküle wie der Proteine BAD, Bcl-2 oder der Procaspase 9. Über die indirekte Hemmung des Tumorsuppressors p53 nimmt Akt Einfluss auf die Zellproliferation. Auch auf die Gentranskription nimmt Akt direkt oder indirekt unter anderem über Aktivierung des Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells- (NF $\kappa$ B-) Transkriptionsfaktors Einfluss. Zudem ist aktiviertes Akt in der Lage über den Gamma-Amino-Buttersäure-Rezeptor A (GABA<sub>A</sub>-R) in die neuronale Regulation und über die Glycogen-Synthase-Kinase 3 (GSK-3) in die Regulation des Glucosestoffwechsels einzugreifen. Akt ist also ein vielfältiges Protein, das eine zentrale Stellung in der Regulation der Zellfunktion einnimmt und das Überleben der Zelle unterstützt (Kapoor und O'Rourke 2003, Löffler und Petrides 2002, McCubrey et al. 2007, Silbernagl und Lang 2009, Scheid 2007, Martelli et al. 2012).

Eines der wichtigsten untergeordneten Moleküle von Akt ist die Proteinkinase mammalian Target of Rapamycin (mTor). Es handelt sich um eine großmolekulare S-/T-Kinase, die durch Rapamycin und seine Analoga, die sogenannten Rapalogs, hemmbar ist (Abraham und Gibbons 2007). Akt aktiviert mTor in einem mehrschrittigen Prozess. Es phosphoryliert und inaktiviert Tuberin, das zusammen mit Hamartin im Tuberin Sclerosis Complex (TSC1/2) gebunden ist. Die inhibierende Wirkung von TSC1/2 auf das Ras homolog enriched in brain- (Rheb-) G-Protein wird aufgehoben und Rheb ist nun in der Lage den mammalian Target of Rapamycin Komplex 1 (mTorC1), der aus mTor und der regulatorischen Untereinheit Regulatory associated protein of mTor (Raptor) besteht, zu aktivieren (Silbernagl und Lang 2009).

Die mTor-Protein-Kinase überträgt Signale, die das Zellwachstum und den Zellmetabolismus in Abhängigkeit von Wachstumsfaktor- und Nährstoffverfügbarkeit regulieren. Der mTorC1-Komplex reguliert dabei die Proliferation der Zelle in Abhängigkeit vom Nährstoffangebot. Über Aktivierung der ribosomalen Protein S6-Kinase beta-1 (S6K1) ermöglicht der Komplex die vermehrte Translation von messenger Ribonukleinsäure (mRNA), die für ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren kodiert. Es kommt zur Steigerung der Translationskapazität. Bei Nährstoffmangel reguliert der mTorC1-Komplex einen Prozess, der als Makroautophagie bezeichnet wird. Dabei kommt es zur Degradierung zytoplasmatischer Bestandteile und zu deren Recycling in Autophagosomen. Über Mechanismen, die bisher nur wenig verstanden sind, greift der mTorC1-Komplex in den zellulären Metabolismus ein und reguliert die Aminosäure-Biosynthese, die Glucose-Homöostase und den Lipid-Metabolismus. Raptor ist als Bestandteil des mTorC1-Komplexes in der Lage in den Zellkern zu translozieren und dort die Aktivität verschiedener nahrungs- und stressabhängiger Transkriptionsfaktoren zu modifizieren (Vazquez-Martin et al. 2011). So kontrolliert mTorC1 die Transkription zahlreicher Gene, die in metabolische und biosynthetische Signalwege involviert sind, beispielsweise die Transkription der ribosomalen Ribonukleinsäuren (RNA) mittels der Transkriptionsfaktoren Transcriptional Intermediary Factor 1 Alpha (TIF-IA) und Upstream Binding Factor (UBF) (Bandhakavi et al. 2010, Hay und Sonenberg 2004, Wullschleger et al. 2006).

Während der mTorC1-Komplex somit die zeitlichen Aspekte des Zellwachstums reguliert, bestimmt der mTorC2-Komplex über die räumlichen Aspekte. Dazu kontrolliert er die zellzyklusabhängige Polarisierung des Aktin-Zytoskeletts direkt oder indirekt über Aktivierung der Ras homolog-1- (Rho1-) GTPase mit anschließender Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges. Zudem ist der mTorC2-Komplex der übergeordnete Regulator von Akt. Aktuell ist das Wissen bezüglich der übergeordneten Regulatoren und nachgestellten Effektoren des mTorC2-Komplexes jedoch noch begrenzt (Wullschleger et al. 2006).

Der PI3K-/Akt-Signalweg stellt alles in allem eine sehr komplexe Signaltransduktionskaskade dar, die zentral an der Übertragung wachstumsfaktorabhängiger stimulatorischer Signale zum mTor-Komplex beteiligt ist, der letztendlich positiv in Zellwachstums- und Proliferationsvorgänge eingreift (Abraham und Gibbons 2007). Zum besseren Verständnis der erläuterten Signalkaskade siehe Abb. 2.



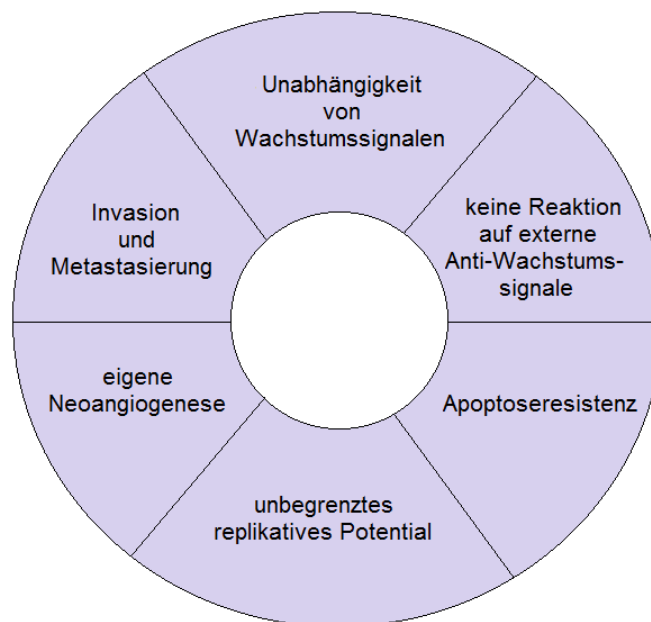
**Abb. 2: Der PI3K-/Akt-Signalweg modifiziert nach (Scheid 2007, Thoreen und Sabatini 2008)**

In der Abbildung wird der Ablauf der PI3K-/Akt-Signalkaskade schematisch dargestellt. Es wird gezeigt, dass es zwei Möglichkeiten der Aktivierung der PI3-Kinase gibt, einmal direkt über den Tyrosinkinaserzeptor und andererseits indirekt über Aktivierung des Ras-G-Proteins. Die aktivierte PI3-Kinase aktiviert über einige Zwischenschritte die Akt-Kinase, die bereits direkt zahlreiche Zellfunktionen modifiziert oder dies über die Aktivierung des mTor-Komplex 1 erreicht.

## 1.2. Autonomes Zellwachstum (Tumorigenese)

Als Tumor im engeren Sinne bezeichnet man eine abnorme Gewebemasse, die auf eine autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen zurückgeht, sich weder strukturell noch funktionell in das Normalgewebe eingliedert und auch dann noch weiterwächst, wenn der auslösende Reiz nicht mehr wirksam ist (Riede et al. 2004).

Hanahan und Weinberg beschrieben im Jahr 2000 sechs Charakteristika, die einen bösartigen Tumor, der allgemein hin nur als ‚Krebs‘ bezeichnet wird, kennzeichnen: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, fehlende Reaktion auf externe Anti-Wachstumssignale, Immortalisierung durch Apoptoseumgehung, unbegrenztes replikatives Potential, eine eigenständige Neoangiogenese sowie Invasion und Metastasierung (Hanahan und Weinberg 2000). In Abbildung 3 sind diese Tumorcharakteristika, auf die im Folgenden eingegangen werden soll, zusammenfassend dargestellt. Anhand dieser Merkmale, die mit unterschiedlicher Gewichtung in die Tumorigenese involviert sind, ist es möglich, die Entstehung maligner Tumoren nachzuempfinden (Riede et al. 2004).



**Abb. 3 Charakteristika maligner Tumoren modifiziert nach (Roessner et al. 2008)**

Die Abbildung stellt schematisch die sechs Charakteristika maligner Tumoren dar, die im Jahr 2000 von Hanahan und Weinberg beschrieben wurden.

### 1.2.1. Voraussetzung für die Tumorentstehung

Krebs ist eine genetische Erkrankung (Riede et al. 2004). Obwohl sich Tumoren in der Regel von einer entarteten Ausgangszelle ableiten, man spricht von einer monoklonalen Genese, sind für die endgültige Tumorbildung mehrere Mutationen notwendig. Im Laufe der Zeit entwickeln Tumorzellen aufgrund des Selektionsdrucks durch den Tumorträger oder durch therapeutische Maßnahmen weitere Mutationen, die zur Tumorerheterogenität und fortschreitenden Entartung des Tumors führen

(Roessner et al. 2008). Eine einzelne Mutation ist damit für die Entstehung maligner Tumoren nicht ausreichend. Aufgrund zahlreicher zellulärer Reparatur- und Schutzmechanismen sind Mutationen jedoch seltene Ereignisse. Es erscheint kaum möglich, dass es während eines Menschenlebens in einer Zelle zu so zahlreichen Mutationen kommt, die letztendlich für die Entstehung eines malignen Tumors notwendig sind. Die Genome von Tumorzellen müssen dafür ein verstärktes mutagenes Potential entwickelt haben. Dieses erlangen sie durch Mutationen, die zu Dysfunktionen der „Caretaker-Gene“ führen. Über den Funktionsverlust dieser Gene kommt es zu einer Genominstabilität, die den prämaligen Zellen als Mittel dient, die sechs von Hanahan und Weinberg beschriebenen Endpunkte der Malignität zu erreichen (Hanahan und Weinberg 2000). Im Verlauf kommt es aufgrund der Instabilität des Genoms zu weiteren zahlreichen Mutationen in Genen, welche unter physiologischen Bedingungen die zelluläre Proliferation und Homöostase steuern. Das normale Gleichgewicht zwischen Wachstum und Differenzierung ist gestört und die Voraussetzungen für ein unkontrolliertes zelluläres Wachstum sind geschaffen (Löffler und Petrides 2002, Roessner et al. 2008) .

### **1.2.2. Unabhängigkeit von Wachstumssignalen**

Jede normale Zelle benötigt die Stimulation durch Wachstumsfaktoren, um vom ruhenden in ein aktiv proliferierendes Stadium wechseln zu können. Eine Proliferation in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren ist nicht möglich.

Tumorzellen sind jedoch in der Lage diesen homöostatischen Mechanismus zu durchbrechen und unabhängig von der Stimulation durch Wachstumsfaktoren zu proliferieren. Sie entwickeln die Fähigkeit eigenständig Wachstumsfaktoren zu bilden und darauf auto- oder parakrin zu reagieren. Über Veränderungen von Zelloberflächenrezeptoren können Tumorzellen ihre Proliferation regulieren. Diese sind in mutierten Zellen überexprimiert, sodass die Tumorzelle auf normale Wachstumsfaktorlevel mit stärkerem Wachstum reagiert. Auch strukturelle Veränderungen der Rezeptoren können zu deren konstitutiver Aktivierung führen. Außerdem können Tumorzellen durch die Modifikation intrazellulärer Signalmoleküle in die Wachstumsregulation eingreifen, sodass mitogene Signale ohne Stimulation durch übergeordnete Rezeptoren weitergeleitet werden. So kommt es beispielsweise zu einer

Proliferationssteigerung bei Mutationen des Ras-Proteins (Hanahan und Weinberg 2000).

Die Fähigkeit von Tumorzellen unabhängig von Wachstumssignalen zu proliferieren beruht auf Mutationen der Protoonkogene. Dabei handelt es sich um Gene, die für das normale Zellwachstum essentiell sind. Bei nur einer aktivierenden Mutation der Protoonkogene kommt es zur Bildung von Onkogenen. Deren Genprodukte, die Onkoproteine, sind veränderte Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Rezeptortyrosinkinasen, intrazelluläre Signalproteine oder nukleäre Transkriptionsfaktoren, die die unkontrollierte Proliferation über permanente Aktivierung der benötigten Signalwege diktieren (Löffler und Petrides 2002, Roessner et al. 2008).

### **1.2.3. Fehlende Reaktion auf externe Anti-Wachstumssignale**

Überschüssige Zellteilung wird in normalen Zellen durch wachstumshemmende Faktoren verhindert (Silbernagl und Lang 2009). Die Proliferation wird durch Überführung der Zellen in das Ruhestadium des Zellzyklus oder durch Ausdifferenzierung der Zellen mit Erwerb gewebstypischer Merkmale blockiert. Dabei spielen Tumorsuppressorgene eine Schlüsselrolle. Ein wichtiger Vertreter dieser Genfamilie ist das Retinoblastom- (Rb-) Gen, dessen Genprodukt den Transkriptionsfaktor E2-Promotor Binding Factor (E2F) bindet und hemmt. Dieser kontrolliert die Expression von Genen, die für das Voranschreiten des Zellzyklus essentiell sind. Das aktive, hypophosphorylierte Rb-Gen hemmt somit den Zellzyklus (Hanahan und Weinberg 2000). Besonders Tumorzellen müssen die Wirkung der antiproliferativen Signale vermeiden. So ist das Rb-Gen in mehr als 60 Prozent der menschlichen Tumoren deletiert oder funktionsunfähig mutiert. Die Mutation von Tumorsuppressorgenen ist für viele Tumoren ein wichtiges charakteristisches Merkmal, infolge dessen die Tumorzellen zu erhöhten Proliferationsraten neigen (Löffler und Petrides 2002, Riede et al. 2004).

### **1.2.4. Umgehung der Apoptose**

Die Fähigkeit der exzessiven Vermehrung von Tumorzellen, ist nicht nur von der Zellproliferation, sondern auch von der Rate des Zellverlustes durch Apoptose abhängig. Das apoptotische Programm ist in latenter Form in allen Zelltypen des

Körpers vorhanden. Sensoren beurteilen die Funktionsfähigkeit und Gesundheit der Zellen und ihrer Umgebung und aktivieren bei Störungen spezifische Effektormoleküle. Diese stimulieren den extrinsischen oder intrinsischen Weg der Apoptose. Die erworbene Apoptoseresistenz ist ein Kennzeichen der meisten Tumorzellen. Hierbei können zahlreiche apoptoseregulierende Moleküle beeinflusst werden. So ist das p53-Tumorsuppressorgen, dessen Aktivierung im Normalfall zur Mobilisierung von Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Reparaturenzymen oder zur Einleitung der Apoptose führt, in mehr als 50 Prozent der menschlichen Tumoren zur Funktionsunfähigkeit mutiert. Zudem kommt es in zahlreichen Tumoren zu einer verstärkten Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges, der antiapoptotische Überlebenssignale vermittelt. Die Veränderungen an verschiedenen Komponenten der Apoptosemaschinerie können daher die Dynamik der Tumorprogression erheblich beeinflussen (Hanahan und Weinberg 2000).

#### **1.2.5. Unbegrenztes replikatives Potential**

Durch permanente Aktivierung proliferativer Signale, mangelnde Reaktion auf Antiwachstumssignale und Blockierung der Apoptose kommt es zu einer steten Wachstumsstimulation der malignen Tumorzellen (Löffler und Petrides 2002). Dies ist für die Sicherung eines expansiven Tumorwachstums jedoch nicht ausreichend.

Nahezu alle menschlichen Zellen besitzen ein zelleigenes Programm, das deren uneingeschränkte Vermehrung limitiert. Normale Zellen haben eine Kapazität von 60 bis 70 Teilungen bis es zu einem Wachstumsstop kommt. Bedingt wird das limitierte Teilungspotential durch kurze, repetitive Sequenzelemente an den Enden der Chromosomen, den Telomeren. Nach jeder Zellteilung kommt es zum Verlust von 50 bis 100 Basenpaaren der Telomer-DNA, sodass die Chromosomenenden nach einigen Teilungszyklen nicht mehr geschützt sind. Es kommt zur End-zu-End-Fusion der Chromosomen und zum Tod der Zelle.

Auch prä-maligne Zellpopulationen erschöpfen ihre Fähigkeit zur Zellverdopplung und müssen diese Mortalitätsbarriere durchbrechen, um ihr tumorigenes Potential zu entfalten. Dafür müssen die Telomere erhalten bleiben. Dies verwirklichen Tumorzellen durch die Expression des Telomerase-Enzyms, das die verlorenen repetitiven Sequenzen ergänzt. Mehr als 90 Prozent der Tumoren zeigen eine Telomerase-

aktivität. Der Telomererhalt gilt als Schlüsselkomponente für die Fähigkeit der unlimitierten Replikation (Hanahan und Weinberg 2000, Roessner et al. 2008).

#### **1.2.6. Eigenständige Neoangiogenese und Entdifferenzierung der Tumorzellen**

Die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen ist für das Zellüberleben essentiell. Dafür bedarf es eines engen Kontakts zwischen Zellen und Blutkapillaren. Tumore sind somit bei Überschreitung einer Größe von wenigen Millimetern zur Bildung neuer Blutgefäße (Neoangiogenese) gezwungen, um ihr Überleben zu gewährleisten. Hierfür verschieben sie die Balance zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren durch vermehrte Freisetzung des proangiogenen Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) oder durch verminderte Bildung antiangiogenetischer Faktoren wie Thrombospondin-1 und Angiostatin. Besonders frühe Tumorstadien zeigen eine verstärkte Angiogeneseaktivität (Hanahan und Weinberg 2000, Roessner et al. 2008).

Neben einer verstärkten Gefäßneubildung zeigen maligne Tumorzellen typische von der Norm abweichende Zellveränderungen. Die Zellen sind entdifferenziert. Die Zellkerne maligner Tumoren sind aufgrund chromosomaler Aberrationen verschieden groß, polymorph, polychromatisch und weisen plumpe Nukleoli auf. Die Zellen selbst zeigen sich zunehmend anaplastisch und verlieren den zellulären Zusammenhalt. Durch vereinfachte Stoffwechselleistungen mit Schwerpunkt auf der zellulären Teilung zeigt sich ein verstärkt basophiles Zytoplasma mit zahlreichen Ribosomen. Das Zellplasma ist nur spärlich ausgeprägt, sodass sich eine Verschiebung der Kern-Plasma-Relation zugunsten des Zellkerns zeigt. Die Zellen erscheinen durch den veränderten Aufbau des Zytoskeletts unregelmäßig geformt. Maligne Tumoren verschiedener histologischer Herkunft tragen so meist gemeinsame Zeichen der Malignität (Riede et al. 2004).

#### **1.2.7. Gewebeinvasion und Metastasierung**

Früher oder später erwerben maligne Tumorzellen die Fähigkeit, der primären Tumormasse zu entkommen und neue Regionen im Körper zu kolonisieren, wo Platz und Nährstoffvorrat nicht limitiert sind. Im Rahmen dessen entwickeln einige Tumorzellen amöboide Fähigkeiten und sind in der Lage in umgebene Gewebe einzu-



wandern (Infiltration) und in Blut- und Lymphgefäße einzubrechen (Invasion). Diese Verschleppung des Tumors von einer Körperstelle an eine andere wird als Metastasierung bezeichnet. Sie ist in mehr als 90 Prozent der Fälle Ursache für den Tod im Rahmen einer Tumorerkrankung, spielt jedoch für Hirntumoren eine untergeordnete Rolle (Hanahan und Weinberg 2000, Riede et al. 2004, Roessner et al. 2008).

### **1.3. Signalwegveränderungen in Hirntumoren**

Die Signaltransduktion kann an jedem Punkt der Signalkaskade unterbrochen werden. Signalwegveränderungen in Hirntumoren können verschiedene Ursachen haben. Durch Fehlregulation der zugrundeliegenden Gene durch Chromosomen- oder Genmutationen kann es zur Beeinflussung von Molekülen des Signalweges kommen. Eine veränderte RTK-Signalübertragung durch Genamplifikation, -überexpression, aktivierende Mutationen oder auto- und parakrine Loops kann zu Veränderungen in den Signalwegen führen (Kapoor und O'Rourke 2003). Auch durch die verstärkte Expression von Wachstumsfaktoren können intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert werden (Simon et al. 2007). Der genaue molekulare Mechanismus der Hirntumorentstehung ist dabei heute noch weit davon entfernt verstanden zu werden (Basto et al. 2005). Dennoch ist bekannt, dass die Bildung primärer Hirntumoren der schrittweisen Akkumulation verschiedener typischer Veränderungen bedarf, die die Signaltransduktionswege beeinflussen (Kapoor und O'Rourke 2003). Typische Veränderungen, die teilweise die untersuchten Signalkaskaden in primären Hirntumoren beeinflussen, sollen im Folgenden betrachtet werden.

#### **1.3.1. Typische chromosomale und genetische Veränderungen von Meningeomen**

Meningeome gelten als die ersten soliden Tumoren, die mit einer charakteristischen zytogenetischen Veränderung in Verbindung gebracht werden konnten (Perry et al. 2004). Diese Alteration ist eine Monosomie 22, die in bis zu 50 Prozent der sporadischen Meningeome zu finden ist (Riemenschneider et al. 2006). Sie geht mit der Inaktivierung des Neurofibromatose 2- (NF2-) Tumorsuppressorgens einher. Neurofibromatose Typ 2 gilt als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung von

Meningeomen. Das NF2-Gen codiert für das Merlin-Protein, dessen Verlust charakteristisch für Meningeome ist. Merlin, das auch als Schwannomin bezeichnet wird, ist ein Mitglied der 4.1 Proteinfamilie, das über Wechselwirkungen mit Aktin-filamenten Zellwachstum und -motilität reguliert (Perry et al. 2004). James et al. zeigten in einer *in vitro*-Studie im Jahr 2009, dass die Herabregulation der Merlin-funktion in arachnoidalen Deckzellen mit deren Umwandlung in meningeomähnliche Zellen einhergeht (James et al. 2009). Der Verlust des Proteins Merlin ist somit ein charakteristisches Merkmal von Meningeomen, das mit deren Initiation in Verbindung gebracht werden kann (Riemenschneider et al. 2006). Auch andere Mitglieder der 4.1 Proteinfamilie, wie die Proteine 4.1B oder 4.1R, können in Meningeomen herabreguliert sein (Perry et al. 2004).

#### **1.3.1.1. Der MAP-Kinase-Signalweg in Meningeomen**

Die intrazellulären Signalwege, die mitogene Signale auf den Zellkern übertragen, sind für Meningeome noch weitgehend unbekannt (Johnson et al. 2001). Der MAP-Kinase-Signalweg ist in benignen und malignen Meningeomen auf verschiedenen Ebenen aktiviert (Mawrin et al. 2005). Die Aktivierung des Signalweges beruht hauptsächlich auf auto- und parakrinen Loops durch die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren. Für Meningeome wurde wiederholt die starke Expression von EGF und TGF- $\alpha$ , Insulin-like Growth Factor-2 (IGF-2), PDGF und deren korrespondierender Rezeptoren EGF-R, Insulin-like Growth Factor-Binding Protein 2 (IGFBP2) und Platelet-derived Growth Factor-Rezeptor (PDGF-R) beschrieben (Johnson et al. 2001, Johnson et al. 2009, Mawrin et al. 2005, Perry et al. 2004, Ragel und Jensen 2010). PDGF gilt als wichtigster Regulator des Meningeomwachstums und überträgt mitogene Signale durch die Aktivierung von ERK über den MAP-Kinase-Signalweg (Johnson et al. 2001). Konstitutiv aktivierte ERK, sowie phosphorylierte MEK-1 wurden in Meningeomen aller Grade nachgewiesen (Johnson et al. 2001, Johnson et al. 2009). In benignen Meningeomen des World Health Organization (WHO) Grades I zeigten immunhistochemische Analysen von Mawrin et al. 2005 die Expression von Ras und phosphoryliertem Raf. In aggressiven Meningeomen zeigten sich deren Expressionslevel deutlich reduziert (Mawrin et al. 2005). Eine Ras-Mutation wurde bisher für Meningeome nicht beschrieben (Johnson et al. 2002).

Obwohl eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges wiederholt beschrieben wurde, fanden Mawrin und Kollegen eine verminderte Aktivierung der Signalkaskade in Meningeomrezidiven. Es müssen also noch andere Signalwege inklusive des PI3K-/Akt-Signalweges essentiell am Wachstum der Meningeome beteiligt sein (Mawrin et al. 2005).

#### **1.3.1.2. Beeinflussung des PI3K-/Akt-Signalweges in Meningeomen**

Wie bereits beschrieben wird die Signaltransduktion in Meningeomen durch Wachstumsfaktoren beeinflusst. Auch für den PI3K-/Akt-Signalweg spielen sie eine essentielle Rolle. So kommt es durch die vermehrte Expression von PDGF und IGF-2 zu einer vermehrten Phosphorylierung von Akt und damit zur Signaltransduktion über die PI3K-/Akt-Kaskade.

Die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Eine Mutation des Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten- (PTEN-) Tumorsuppressorgens wurde dabei für Meningeome bisher nur selten beschrieben (Peters et al. 1998).

Erhöhte Anteile von phosphoryliertem Akt wurden in Meningeomen jeden Grades gefunden. Die vermehrte Phosphorylierung nimmt dabei keinen Einfluss auf die Gesamtmenge von Akt (Johnson et al. 2002). Die Aktivierung der PI3K-/Akt-Signalkaskade geht häufig mit einer malignen Progression einher. Dies zeigen Mawrin et al. 2005, die in ihrer Studie deutlich erhöhte pAkt-Level in atypischen und anaplastischen Meningeomen fanden. Die verstärkte Akt-Phosphorylierung bedingt wiederum eine vermehrte Expression von mTor. Dies wurde von Johnson et al. bei einigen Meningeomen und von Mawrin et al. bei Tumoren von Neurofibromatose Typ 2-Patienten beschrieben (Johnson et al. 2009, Mawrin et al. 2005). Eine detaillierte Untersuchung der dem Akt untergeordneten Effektoren ist für Meningeome bisher nicht erfolgt.

Der PI3K-/Akt-Signalweg vermittelt in Meningeomen Wachstumseffekte, ist allein jedoch wahrscheinlich insuffizient einen Progress der Meningeome zur Malignität zu tragen (Johnson et al. 2009).

### **1.3.2. Typische molekulare und genetische Veränderungen in pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I)**

Die folgende Betrachtung der Signalwegveränderungen in Gliomen erfolgt aufgrund der Komplexität und Spezifität der einzelnen Tumorgade getrennt entsprechend ihrer WHO-Grade.

Die pilozytischen Astrozytome (WHO Grad I) stellen eine „von den WHO Graden II-IV unabhängige Tumorentität mit wenigen Beispielen maligner Transformation“ dar (Louis et al. 2007). Dies wird auch deutlich, betrachtet man die molekularen und genetischen Veränderungen in pilozytischen Astrozytome, die zu denen anderer Gliomgrade deutlich verschieden sind.

Etwa ein Drittel der pilozytischen Astrozytome betreffen Kinder mit Neurofibromatose Typ 1. Durch inaktivierende Mutationen des Neurofibromatose 1- (NF1-) Gens kommt es zur verminderten Funktion des Neurofibromin-Proteins, welches als Ras-Inhibitor fungiert (Lau et al. 2000).

Eine weitere charakteristische Veränderung der pilozytischen Astrozytome beschrieben Jones et al. im Jahr 2008. Sie fanden in 66 Prozent der pilozytischen Astrozytome eine Tandem-Duplikation des Chromosoms 7q34 (Jones et al. 2008). Diese Vervielfältigung wurde in den folgenden Jahren durch multiple Studien bestätigt (Bar et al. 2008, Korshunov et al. 2009, Pfister et al. 2008). Die Duplikation des 7q34-Lokus schließt das telomere Ende des B-Raf-Onkogens ein. Es kommt zur Bildung des BRAF-KIAA1549 Fusionsgens und damit zum Verlust der auto-inhibitorischen Funktion des Wildtyp-B-Raf-Gens (Korshunov et al. 2009).

Neben diesen beiden typischen Alterationen, die die MAP-Kinase-Signalkaskade beeinflussen, zeigen pilozytische Astrozytome kaum charakteristische Veränderungen. Insgesamt weisen sie größtenteils einen normalen Karyotyp auf (Cheng et al. 2000). Die für infiltrierende Gliome typischen Mutationen in den Isocitrat-Dehydrogenase 1- (IDH1-), p53- und p16-Genen wurden für pilozytische Astrozytome nicht oder nur vereinzelt beschrieben (Bar et al. 2008, Cheng et al. 2000, Dunn et al. 2012).

### **1.3.2.1. Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges in pilozytischen Astrozytomen**

Wie bereits beschrieben nimmt der MAP-Kinase Signalweg eine zentrale Rolle in der Entwicklung pilozytischer Astrozytome ein. Er kann in den WHO Grad I- Gliomen durch multiple Mechanismen aktiviert werden.

Zahlreiche Studien wiesen die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges in pilozytischen Astrozytomen über die o.g. NF1-Genmutation nach. Keimzellassoziierte Astrozytome zeigten in einer Studie von Ding et al. 2001 eine deutlich erhöhte p21-Ras-Aktivität (Ding et al. 2001). Eine immunhistochemische Studie von Jentoft et al. zeigte 2011 die verstärkte Immunreaktivität von p-ERK in Neurofibromatose Typ 1-assoziierten pilozytischen Astrozytomen infolge eines NF1-Genverlustes (Jentoft et al. 2011). Da sporadische pilozytische Astrozytome keine NF1-Mutation zeigen, erfolgt die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges in pilozytischen Astrozytomen offensichtlich auch über andere Mechanismen (Louis et al. 2007).

Den mutmaßlichen Hauptmechanismus der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges in sporadischen pilozytischen Astrozytomen stellt die von Jones et al. im Jahr 2008 beschriebene Tandem-Duplikation des Chromosoms 7q34 mit Bildung des konstitutiv aktiven BRAF-KIAA1549 Fusionsgens dar. Jones et al. fanden in weiteren Studien in insgesamt 82 Prozent der untersuchten pilozytischen Astrozytome Veränderungen des MAP-Kinase-Signalweges. Neben der Genfusion BRAF-KIAA1549 beschrieben sie seltenere Events, wie eine Tandemduplikation auf Chromosom 3p25, woraus die Bildung des Fusionsgens SRGAP3-RAF1 resultiert, und eine Insertion von drei Basenpaaren in Codon 598 des B-Raf-Gens, die die aktivierende Hotspot-Mutation V600E nachahmt (Jones et al. 2009).

Mutationen in pilozytischen Astrozytomen sind insgesamt ein eher seltener Mechanismus zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges. Sharma et al. beschrieben im Jahr 2005 eine aktivierende K-Ras-Mutation bei 21 untersuchten pilozytischen Astrozytomen (Sharma et al. 2005). Auch andere Studien beschrieben vereinzelt Mutationen im K-Ras-Gen (Janzarik et al. 2007, Maltzman et al. 1997). Aktivierende Mutationen für Ha- und N-Ras wurden nicht gefunden (Jones et al. 2008, Orian et al. 1992). Pfister et al. beschrieben aktivierende B-Raf-Mutationen im Hotspotcodon V600E in sechs Prozent der untersuchten pilozytischen Astrozytome (Pfister et al. 2008).

Die erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren, wie PDGF, und deren Rezeptoren in pilozytischen Astrozytomen lässt die zusätzliche Aktivierung des MAP-Kinase-Weges durch auto- und parakrine Loops vermuten (Zhu und Parada 2002).

### **1.3.2.2. Der PI3K-/Akt-Signalweg in pilozytischen Astrozytomen**

Neben den relevanten Veränderungen des MAP-Kinase-Signalweges in pilozytischen Astrozytomen wird auch die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges beschrieben. Diese resultiert aus einer Deletion des PTEN-Lokus, die in 32 Prozent der rezidivierenden pilozytischen Astrozytome gezeigt wurde. Das biologisch und auch klinisch aggressive Potential rezidivierender pilozytischer Astrozytome wird somit durch eine zusätzliche Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges zum MAP-Kinaseweg bestimmt (Rodriguez et al. 2011).

### **1.3.3 Charakteristische Veränderungen diffuser Astrozytome (WHO Grad II)**

Die diffusen Astrozytome vom WHO Grad II zeigen in etwa 70 Prozent der Fälle eine charakteristische Mutation im Isocitrat-Dehydrogenase 1- (IDH1-) Gen (Dunn et al. 2012, Kim et al. 2010, Korshunov et al. 2009). Das Gen codiert für das Isocitrat-Dehydrogenase-Enzym und ist durch die Beteiligung am Citratzyklus essentiell für den Stoffwechsel aller Lebewesen.

Die IDH1-Mutation geht oft mit dem Verlust des p53-Tumorsuppressorgens einher, was ein charakteristisches Merkmal infiltrierender Gliome darstellt. Bei diffusen Astrozytomen ist das p53-Tumorsuppressorgen in mehr als 60 Prozent der Fälle mutiert (Huang et al. 2000, Kim et al. 2010). Auch auf chromosomaler Ebene lässt sich der p53-Verlust nachempfinden: Die häufigste chromosomale Veränderung diffuser Astrozytome ist der Verlust des Chromosomenarmes 17q, auf dem das p53-Gen lokalisiert ist (Huang et al. 2000, Kim et al. 2010, Reifenberger et al. 1996).

Abgesehen von der Deletion des Chromosoms 17q sind chromosomale Veränderungen diffuser Astrozytome selten beschrieben, so beispielsweise der Verlust der Chromosomen 6, 13q, 20p und 22q (Reifenberger und Collins 2004).

Mutationen in regulatorisch relevanten Genen wie p14<sup>ARF</sup>, p16<sup>INK4A</sup>, Cyclin-Dependent Kinase 4 (CDK4) oder Rb sind selten beschrieben (Kim et al. 2010, Ohgaki und Kleihues 2007).

### **1.3.3.1. MAP-Kinase-Signalwegveränderungen in diffusen Astrozytomen**

Eine p53-Mutation ist allein nicht in der Lage diffuse Astrozytome zu initiieren (Zhu und Parada 2002). Verschiedene Studien wiesen erhöhte Konzentrationen des Wachstumsfaktors PDGF und dessen Rezeptors nach, was wiederum die Aktivierung der MAP-Kinase-Signalkaskade in diffusen Astrozytomen über einen autokrinen Loop nahelegt (Hermanson et al. 1992, Guha et al. 1995). Andere Varianten der Aktivierung des MAP-Kinase-Weges wie Ras-Mutationen oder B-Raf-Fusionsgene wurden für diffuse Astrozytome nicht beschrieben (Korshunov et al. 2009, Zhu und Parada 2002).

### **1.3.3.2. Veränderungen des PI3K-/Akt-Signalweges in diffusen Astrozytomen**

Auch der PI3K-/Akt-Signalweges ist in diffusen Astrozytomen aktiviert. So wiesen Annovazzi et al. in immunhistochemischen Studien 2009 einen deutlich erhöhten Anteil von nukleär lokalisiertem phosphorylierten Akt nach (Annovazzi et al. 2009). Die PI3K-/Akt-Signalwegaktivierung geht nicht mit Mutationen des PTEN-Tumorsuppressorproteins einher (Cheng et al. 2000), Verluste des PTEN-Chromosomenlokus 10p wurden jedoch in 35 Prozent der diffusen Astrozytome beschrieben (Shapiro 2002).

Die Aktivierung des MAP-Kinase- und PI3K-/Akt-Signalweges in diffusen Gliomen geht häufig mit deren sekundärer Malignisierung hin zu WHO Grad III- und IV-Gliomen einher (Gursel et al. 2011).

### **1.3.4. Molekulare und genetische Besonderheiten anaplastischer Astrozytome (WHO Grad III)**

Anaplastische Astrozytome stellen in der Regel ein intermediäres Stadium auf dem Malignisierungsweg zum Glioblastom dar (Louis et al. 2007). Dies spiegelt sich auch in deren molekularen und genetischen Veränderungen wider.

Verschiedene signalwegrelevante Veränderungen spielen in anaplastischen Astrozytomen eine bedeutende Rolle. So zeigten Sonoda et al. 2001 in Mäusen, dass eine Kombination aus Inaktivierung des p53-Signalweges via p53-Mutationen, Inaktivierung des Rb-Signalweges via Deletionen des p16-Lokus, Telomeraseaktivierung

und Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges zur Bildung intrakranieller Tumore mit Ähnlichkeit zu anaplastischen Astrozytomen führt. Dabei spielen der Verlust des p53- und Rb-Signalweges in anaplastischen Astrozytomen scheinbar eine besondere Rolle, da beide Signalwege zu mehr als 70 Prozent in diesem WHO-Grad deletiert sind (Sonoda et al. 2001b). Wie auch bei anderen infiltrierenden Gliomen findet man in anaplastischen Astrozytomen einen hohen Anteil von p53-Tumorsuppressorgenmutationen von etwa 60 Prozent (Reifenberger und Collins 2004, Watanabe et al. 1997). Andere regulatorisch relevante Gene sind in anaplastischen Astrozytomen in einem höheren Anteil mutiert als in niedrigeren WHO-Graden: p16<sup>INK4A</sup>-, CDK4- und Rb-Mutationen sind in etwa 50% der anaplastischen Astrozytome zu finden (Zhu und Parada 2002). Die für diffuse Astrozytome typische IDH1-Genmutation ist in anaplastischen Astrozytomen nur selten zu finden (Korshunov et al. 2009).

#### **1.3.4.1. Bedeutung des MAP-Kinase-Signalweges in anaplastischen Astrozytomen**

Wie Sonoda et al. in ihrer Studie im Jahr 2001 beschrieben, scheint die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges bei der Initiation anaplastischer Astrozytome eine essentielle Rolle zu spielen. Diverse Studien beschrieben eine vermehrte Expression von onkogenem Ras-Protein in mehr als 40 Prozent der untersuchten anaplastischen Astrozytome (Arvanitis et al. 1991, Orian et al. 1992). Die vermehrte Ras-Expression geht mit der Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges einher und beruht auf multiplen Mechanismen. Eine Mutation in den Genen für Ras wurde in anaplastischen Astrozytomen bisher nicht beschrieben (Lang et al. 1994, Guha et al. 1997). Jedoch wurden in 77 Prozent der untersuchten anaplastischen Astrozytome Vermehrungen in der Kopienanzahl der Ras- und Raf-Gene nachgewiesen (Jeuken et al. 2007). Auch die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren wurde für anaplastische Astrozytome beschrieben, sodass auch hier die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade anteilig über einen autokrinen Rückkopplungsmechanismus erfolgt (Jeuken et al. 2007, Zhu und Parada 2002). Dies betrifft in anaplastischen Astrozytomen neben dem Wachstumsfaktor PDGF und seinem Rezeptor PDGF-R auch die Wachstumsfaktoren EGF und TGF- $\alpha$ , die in bis zu 48 Prozent der untersuchten anaplastischen Astrozytome eine erhöhte Expression zeigen (Kapoor und O'Rourke 2003, Orian et al. 1992).



#### **1.3.4.2. Die PI3K-/Akt-Signalkaskade in anaplastischen Astrozytomen**

Der PI3K-/Akt-Signalweg zeigt eine verstärkte Aktivierung in anaplastischen Astrozytomen. Dies zeigen zahlreiche immunhistochemische Studien, die eine verstärkte Expression von phosphoryliertem Akt in WHO Grad III-Gliomen nachwiesen. Dabei zeigte pAkt eine eher diffuse, zytoplasmatisch gelegene Farbreaktion (Annovazzi et al. 2009, Li et al. 2011, Wang et al. 2004). Die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges erfolgt zu einem gewissen Anteil über die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren in anaplastischen Astrozytomen. Auch Mutationen im PTEN-Tumorsuppressorgen (Louis et al. 2007) und Deletionen des Chromosoms 10q, das den PTEN-Lokus trägt, wurden für anaplastische Astrozytome beschrieben (Shapiro 2002). Die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges in anaplastischen Astrozytomen geht mit der Progression in humane Glioblastome einher (Sonoda et al. 2001b).

#### **1.3.5. Molekulare und genetische Merkmale von Glioblastomen (WHO Grad IV)**

Bei der aggressivsten Form der infiltrativen Gliome unterscheidet man zwei Entitäten: Die Mehrheit der Glioblastome sind primäre Glioblastome. Sie machen 90 Prozent aller Glioblastome aus und zeigen ein rasches Wachstum ohne dass eine vorherige Läsion bekannt ist, das heißt sie entstehen ‚de novo‘. Sekundäre Glioblastome gehen aus den weniger aggressiven Gliomvorstufen der Grade II oder III hervor, wachsen langsamer und sind mit etwa zehn Prozent deutlich seltener als primäre Glioblastome (Louis et al. 2007).

Beide Glioblastomsubtypen zeigen Veränderungen in Genen, die für Bestandteile von Rezeptortyrosinkinase- und zellzyklusregulatorischen Signalwegen kodieren (Parsons et al. 2008). Dabei bedienen sie sich verschiedener Mechanismen, die im Folgenden für die beiden Subtypen getrennt betrachtet werden.

##### **1.3.5.1. Primäre Glioblastome**

Bei primären Glioblastomen ist es aufgrund des rapiden Auftretens schwierig zwischen initiations- und progressionsrelevanten Signalwegen zu unterscheiden. Generell zeigen sie in den gleichen Signalwegen Veränderungen wie auch die sekundären Glioblastome, wobei die Mechanismen der Signalwegbeeinflussung

dabei jedoch andere zu sein scheinen (Zhu und Parada 2002). Die Beeinflussung des p53-Signalweges erfolgt in primären Glioblastomen zu weniger als 30 Prozent durch direkte Mutationen des p53-Tumorsuppressorgens (Ohgaki und Kleihues 2007). Der Funktionsverlust des p53-Tumorsuppressorproteins resultiert in primären Glioblastomen vielmehr aus dem Verlust des Tumorsuppressors p14<sup>ARF</sup> oder der Amplifikation des Mouse double minute 2 homolog- (MDM2-) Gens. Auch der zellzyklusrelevante Rb-Signalweg ist in primären Glioblastomen unterbrochen. Dabei spielt die direkte Mutation des Rb-Gens eine untergeordnete Rolle. Durch Mutationen im p16<sup>INK4A</sup>-Gen kommt es in 40 Prozent der primären Glioblastome zur Unterbrechung des Rb-Signalweges (Zhu und Parada 2002).

Eine weitere charakteristische Veränderung der primären Glioblastome ist die Amplifikation und verstärkte Expression des Wachstumsfaktorrezeptors EGF-R in etwa 40 Prozent der Fälle. Bei Amplifikation zeigen 50-60 Prozent eine mutierte Form des korrespondierenden Rezeptors EGFRvIII. Die Mutation dieses Rezeptors führt wiederum zu dessen konstitutiver Aktivierung (Ohgaki und Kleihues 2007, Riemenschneider et al. 2010).

Der Verlust des Tumorsuppressorproteins PTEN gilt als weiteres charakteristisches Merkmal von Glioblastomen. In primären Glioblastomen ist ein Verlust des chromosomalen Lokus von PTEN (LOH 10q) in 60-80 Prozent der Fälle beschrieben, eine direkte Mutation des PTEN-Gens zeigen dagegen nur 15-40 Prozent der primären Glioblastome (Ohgaki und Kleihues 2007, Knobbe et al. 2002).

### 1.3.5.2 Sekundäre Glioblastome

Im Gegensatz zu primären Glioblastomen zeigen sekundäre ähnlich den weniger aggressiven Vorstufen eine mit bis zu 60 Prozent deutlich erhöhte Mutationsrate des Tumorsuppressorproteins p53 (Watanabe et al. 1996). Auch über den Verlust des Chromosomenarms 17p, auf dem das p53-Gen lokalisiert ist, wird der p53-Signalweg in sekundären Glioblastomen gestört (Louis 1994).

Der progressionsrelevante Rb-Signalweg wird in sekundären Glioblastomen nur in etwa vier Prozent der Fälle durch Deletionen des p16<sup>INK4A</sup>-Tumorsuppressorgens beeinflusst (Zhu und Parada 2002). Häufiger kommt es zur direkten Inaktivierung des Rb-Gens durch Promotormethylierungen in etwa 43 Prozent der sekundären Glioblastome (Ohgaki und Kleihues 2007).

Die für primäre Glioblastome typische Amplifikation des EGF-Rezeptors kommt in sekundären Glioblastomen nur selten vor (Zhu und Parada 2002). Ebenso sind kaum Veränderungen am PTEN-Gen und seinem chromosomalen Lokus zu finden (Tohma et al. 1998). Die Aktivierung von RTK-Signalwegen scheint auf anderen Mechanismen zu beruhen, wie der vermehrten Expression des Wachstumsfaktors PDGF und seines Rezeptors im Sinne einer autokrinen Rückkopplungsschleife (Kleihues und Ohgaki 1999).

Der Verlust der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase- (MGMT-) Expression durch eine Promotorhypermethylierung ist typisch für bis zu 70 Prozent der sekundären Glioblastome (Ohgaki und Kleihues 2007). Der MGMT-Methylierungsstatus spielt eine wichtige prädiktive Rolle bezüglich des Ansprechens einer Chemotherapie mit Temozolomid (Riemenschneider et al. 2010).

Zusätzlich wurde für sekundäre Glioblastome in 54 Prozent der Fälle ein Verlust der Heterogenität des Chromosoms 19, in drei Prozent eine Missense-Mutation des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase Catalytic Subunit Alpha- (PIK3CA-) Gens, das für die katalytische  $\alpha$ 110-Untereinheit von PI3K kodiert, sowie in zwölf Prozent eine Mutation im IDH1-Gen beschrieben (Kita et al. 2007, Parsons et al. 2008, Shapiro 2002).

#### **1.3.5.3. Veränderungen des MAP-Kinase- und PI3K-/Akt-Signalweges in Glioblastomen**

Die Aktivierung der RTK-Signalwege MAP-Kinase und PI3K-/Akt wurde in 88 Prozent aller humanen Glioblastome beschrieben (Dunn et al. 2012).

Verschiedene Autoren berichten über eine verstärkte Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges. So beschrieben Feldkamp et al. 1999 und Guha et al. 1997 eine verstärkte Ras-Aktivität und erhöhte Level von Ras-GTP in zahlreichen humanen Glioblastomen (Feldkamp et al. 1999, Guha et al. 1997). Orian et al. beschrieben bereits im Jahr 1992 eine vermehrte Expression von Ha- und N-Ras und auch die Raf Proteine Raf-1 und B-Raf zeigten in einer Studie von Lyustikman im Jahr 2008 in Glioblastomen erhöhte Level (Orian et al. 1992, Lyustikman et al. 2008). Die Signalverstärkung der nachgestellten Mitglieder des MAP-Kinase-Signalweges wurde mit einer verstärkten ERK-Aktivität in 34,5 Prozent der untersuchten Glioblastome beschrieben (Mizoguchi et al. 2006).

Die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges in Glioblastomen ist nur zu einem kleinen Anteil auf Mutationen zurückzuführen. Für keines der drei Ras-Gene wurde in Glioblastomen eine Mutation nachgewiesen (Guha et al. 1997, Gomori et al. 1999). Auch Raf-Mutationen stellen ein seltenes Ereignis dar: Basto et al. und Hagemann et al. wiesen in den von ihnen untersuchten Glioblastomen B-Raf-Mutationsraten von lediglich drei bis sechs Prozent nach (Basto et al. 2005, Hagemann et al. 2009). Der Hauptaktivierungsmechanismus des MAP-Kinase-Signalweges in Glioblastomen scheint also ein anderer zu sein.

Sowohl in primären als auch in sekundären Glioblastomen zeigen sich verstärkt exprimierte Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktorrezeptoren. Die verstärkte Expression von EGF-R in primären und PDGF in sekundären Glioblastomen stellt einen wichtigen Weg zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges dar (Hu et al. 2005, Jeuken et al. 2007, Kapoor und O'Rourke 2003).

Die meisten humanen Glioblastome gehen mit einer Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges einher. Zahlreiche Autoren beschrieben in 70-80 Prozent der Glioblastome eine verstärkte Aktivierung von Akt (Lyustikman et al. 2008, Sonoda et al. 2001b, Wang et al. 2004) und in 44 Prozent eine verstärkte Aktivierung seines nachgestellten Effektors mTor (Li et al. 2011). Die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges beruht wiederum auf verschiedenen Mechanismen.

Obwohl in Glioblastomen keine aktivierenden Akt- oder mTor-Mutationen gefunden wurden (Sunayama et al. 2010), beeinflussen multiple Mutationen die Aktivität des PI3K-/Akt-Signalweges. Akhavan et al. fanden in ihrer Studie im Jahr 2010 aktivierende Mutationen der regulatorischen oder katalytischen Untereinheit von PI3K, die zehn Prozent der Aktivierung des Signalweges ausmachen (Akhavan et al. 2010). Auch Mutationen im PIK3CA-Gen wurden in bis zu sieben Prozent der Glioblastome beschrieben (Kita et al. 2007). Die größte Rolle in der Aktivierung des PI3K-Signalweges spielt die Mutation des PTEN-Tumorsuppressorgens, die in bis zu 50 Prozent der Glioblastome nachgewiesen wurde (Akhavan et al. 2010, Furnari et al. 2007). Auch die Deletion von Chromosom 10, auf dem das PTEN-Gen lokalisiert ist, ist für bis zu 40 Prozent der Glioblastome beschrieben (Kapoor und O'Rourke 2003). Die vermehrte Expression des Wachstumsfaktorrezeptors EGF-R leistet einen großen Beitrag an der Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges in Glioblastomen, besonders wenn kein PTEN-Genverlust vorliegt (Choe et al. 2003).

Sowohl der MAP-Kinase- als auch der PI3K-/Akt-Signalweg spielen somit eine entscheidende Rolle in der Bildung von bzw. Progression der Gliome zu Glioblastomen. Die Aktivierung eines der beiden Signalwege allein ist jedoch insuffizient für die Bildung von Glioblastomen (Holland et al. 2000). Verschiedene Studien zeigten jedoch im Mausmodell, dass die Koexpression von onkogen aktiviertem Ras und Akt in neuronalen Progenitorzellen zur Bildung von Glioblastomen führt (Hagemann et al. 2009, Holland et al. 2000, Hu et al. 2005, Zhu und Parada 2002). Die Kombination beider Signalwege ist damit modellgebend für die Biologie der Erkrankung (Holland et al. 2000).

## 2. Fragestellung und Ziele der Arbeit

Der MAP-Kinase- und PI3K-/Akt-Signalweg wurden als wichtigste onkogene Signalwege primärer Hirntumore beschrieben (Wong et al. 2007). Die Aktivierung der Signalwege ist dabei wesentlich an der Initiation und Progression primärer Hirntumore beteiligt (Zhu und Parada 2002). Bisher gibt es jedoch nur begrenzte Informationen über die Expression und Rolle der Schlüsselproteine beider Signalwege in den einzelnen Malignitätsgraden der Hirntumore.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression der Schlüsselproteine der beiden Signalwege, sowie deren Beziehung zum Malignitätsgrad des jeweiligen Tumors darzustellen, um damit einen umfassenderen Überblick über die Rolle der Signalwege in primären Hirntumoren zu gewinnen.

Zur Bearbeitung der Fragestellung dienen dabei humane Meningeome und Gliome aller WHO-Grade, in denen die Expression signalwegrelevanter Moleküle immunhistochemisch mittels direkter Antikörperfärbung ermittelt werden soll. Dabei werden für den MAP-Kinase-Signalweg die relevanten Proteine Ras, Raf und ERK und für den PI3K-/Akt-Signalweg die Moleküle Akt, mTor und dessen aktivierte Form phospho-mTor betrachtet.

Die Auswertung erfolgt semiquantitativ über die mikroskopische Einschätzung der Farbintensitäten der Antikörperfärbungen in den jeweiligen WHO-Graden. Des Weiteren soll betrachtet werden, in welchen histologischen Bereichen die jeweiligen Schlüsselproteine lokalisiert sind, um eine eventuelle Variation der Expression in verschiedenen Regionen der Tumore zu ermitteln.

Die ermittelten Ergebnisse werden im Anschluss statistisch ausgewertet und diskutiert.

### 3. Methodik

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Gewebeproben

Die für die Versuche verwendeten humanen Tumorpräparate wurden zum größten Teil von Herrn Prof. Dr. Heppner und Priv-Doz. Dr. Koch vom Institut für Neuropathologie der Charité- Universitätsmedizin Berlin in Form von geschnittenem Tumorgewebe zur Verfügung gestellt. Die Tumorproben wurden hierbei direkt aus den Operationsresektaten gewonnen. Darüberhinaus standen intraoperativ gewonnene Tumorproben der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung.

Einen Überblick über die verwendeten Tumorentitäten liefert Tabelle 1.

**Tabelle 1 : Übersicht der verwendeten Gewebeproben**

<b>Gewebeprobe</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Prozent (%)</b>
Meningeom WHO Grad I	11	13,9
Meningeom WHO Grad II	8	10,1
Meningeom WHO Grad III	8	10,1
Astrozytom WHO Grad I	16	20,3
Astrozytom WHO Grad II	12	15,2
Astrozytom WHO Grad III	16	20,3
Glioblastoma multiforme	8	10,1
<b>Summe</b>	<b>79</b>	<b>100</b>

### 3.1.2. Materialien

Eine Zusammenfassung über die für die Herstellung der Schnittpräparate und die immunhistochemische Färbung verwendeten Materialien gibt Tabelle 2.

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Materialien**

Name	Firma	Herkunft
Aceton reinst Xylol reinst	Carl Roth GmbH & Co KG	Karlsruhe, Deutschland
Antikörper MAP-Kinase-Signalweg: Maus Anti- pan Ras monoklonaler Primär-AK		
Kaninchen Anti- Raf-B polyklonaler Primär AK	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg, Deutschland
Kaninchen Anti-p-Erk 1/2 polyklonaler Primär-AK		
Antikörper PI3K-/Akt-Signalweg: Kaninchen Anti-Akt polyklonaler Primär-AK		
Kaninchen Anti- mTor monoklonaler Primär-AK	Cell Signaling Technology, Inc.	Danvers, Massachusetts
Kaninchen Anti-phospho-mTor monoklonaler Primär-AK		
Antikörper Verdünnungslösung	DAKO Diagnostika	Hamburg, Deutschland



Aquatex <sup>®</sup> Eindeckmittel (wässrig)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Deckgläser, 24x60 mm	Menzel-Gläser <sup>®</sup>	Braunschweig, Deutschland
Duale-Endogene-Enzym-Blockierungslösung	DAKO Diagnostika	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Tubes, Pipettenspitzen	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Hämatoxylin-Lösung	SIGMA <sup>®</sup> -Aldrich	Dreisenhofen, Deutschland
Maus-Linker (EnVision <sup>™</sup> FLEX) Kaninchen-Linker (EnVision <sup>™</sup> FLEX)	DAKO Diagnostika	Hamburg, Deutschland
Mikrotomklingen	FEATHER <sup>®</sup> -Microme Blades	Japan
Pinzel	Pelikan <sup>®</sup>	Hannover, Deutschland
REAL <sup>™</sup> Detection Kit (K5005) <u>Inhalt:</u> - biotinylierter Sekundär AK - Streptavidin-Alkalische Phosphatase - Chromogen Rot 1,2,3 (x28) - AK Substrat Puffer - Levamisol (x501)	DAKO Diagnostika	Hamburg, Deutschland

REAL™ EnVision™ Detection Kit  
(K5007)

Inhalt: - Sekundärer Ziegen-AK mit  
Peroxidase (HRP)-Molekülen  
(HRP Rabbit/Mouse)  
- AK Substratpuffer  
- 3,3'-Diaminobenzidin-  
Tetrahydrochlorid  
(DAB+ Chromogen (x50) )

DAKO Diagnostika

Hamburg,  
Deutschland

Super Frost® Plus Objektträger  
gebrauchsfertig

Menzel-Gläser®

Braunschweig,  
Deutschland

TRIZMA® Base  
EDTA-Lösung  
Tween 20

SIGMA®-Aldrich  
Chemie GmbH

Dreisenhofen,  
Deutschland

TRIZMA® Base

SIGMA®-Aldrich  
Chemie GmbH

Dreisenhofen,  
Deutschland

NaCl, reinst

E. Merck

Darmstadt,  
Deutschland

Tween 20

### 3.1.3. Geräte

Die verwendeten Geräte werden in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Geräteauflistung**

Gerät	Firma	Herkunft
Analysenwaage	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Färbekasten nach Hellendahl	Carl Roth GmbH&Co	Karlsruhe, Deutschland

Hitzeschrank Typ 54010	Medax Nagel GmbH	Kiel, Deutschland
Laborzentrifuge pico	Heraeus Instruments	Osterode, Deutschland
Lichtmikroskop DME	Leica Microsystem Ltd.	Heerbrugg, Schweiz
Mikroskopkamera Typ DFC 290	Leica Microsystem Ltd.	Heerbrugg, Schweiz
Mikrotom HM 335 E	MICROM GmbH	Walldorf, Deutschland
1000µl , 200µl, 2-20µl Eppendorf Research Pipetten	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Rotilabo®-Färbekammer	Carl Roth GmbH&Co	Karlsruhe, Deutschland
Rotilabo®-Objektträgerhalter	Carl Roth GmbH&Co	Karlsruhe, Deutschland
Vortex-Genie 2™	Scientific Industries	Bohema, USA
Wasserbad Typ 1052	Gesellschaft für Labortechnik GmbH	Burgwedel, Deutschland

### **3.2. Methoden**

#### **3.2.1. Herstellen der Schnittpräparate**

Das Tumorgewebe stand zum größten Teil bereits als fertige 3µm-Schnittpräparate durch das Institut für Neuropathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur

Verfügung, sodass lediglich 16 in Paraffin eingebettete Astrozytome zur Ergänzung der Tumorbank geschnitten wurden.

Nachdem die Paraffinblöcke für mindestens eine Stunde bei  $-15^{\circ}\text{C}$  gefroren wurden, spannte man sie in den Schneideapparat des Mikrotoms ein. Mit Hilfe des Mikrotoms wurden  $3\mu\text{m}$  dicke Schnitte vom gefrorenen Paraffinblock getrennt, die mittels Pinsel und Pinzette vorsichtig zum Glätten des Gewebeschnittes in ein ca.  $50^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad gelegt wurden. Die schwimmenden Astrozytomschnitte wurden mit jeweils einem Objektträger aufgefangen und im Folgenden für eine Stunde bei  $60^{\circ}\text{C}$  im Hitzeschränk getrocknet, um das Gewebe am Objektträger zu fixieren. Auf diese Weise wurden von den zur Verfügung stehenden Astrozytomen je nach Schnittfähigkeit der Probe acht bis elf Schnittpräparate hergestellt, um genügend Ausgangsmaterial für die geplante immunhistochemische Färbung zu gewinnen.

### **3.2.2. Entparaffinieren der Gewebeschnitte**

Das Entparaffinieren der Schnittpräparate erfolgte mit Hilfe der Xylol-Aceton-Reihe. Dafür wurden jeweils zwölf Objektträger mit  $3\mu\text{m}$ -Schnitten des Tumormaterials in einen Objektträgerhalter sortiert, der nach folgendem Schema mit Xylol bzw. Aceton gefüllt wurde: Auf zwei Phasen reinsten Xylols á fünf Minuten folgten drei Phasen reinsten Acetons á zwei Minuten. Zur Rehydrierung folgten jeweils 2 Minuten in Aceton-Leitungswassergemischen mit sinkender Acetonkonzentration, beginnend mit einem Verhältnis von 2:1, gefolgt von 1:2. Abschließend wurden die Schnitte in Leitungswasser noch einmal zehn Minuten gründlich gewaschen. Das Ergebnis dieses Arbeitsschrittes waren entparaffinierte, rehydrierte Gewebeschnitte, die nun für die immunhistochemische Färbung bereitstanden.

### **3.2.3. Die immunhistochemische Färbung**

Die immunhistochemische Färbung der Tumorpräparate erfolgte mit zwei verschiedenen Färbekits der Firma DAKO Diagnostika. So wurden die Anti-pan Ras-, Anti-Raf-B-, Anti-p-Erk1/2- und Anti-Akt-Primärantikörper mit Hilfe des REAL<sup>TM</sup>EnVision<sup>TM</sup> Detection Systems Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse gefärbt, während für die Primärantikörper Anti-mTor und Anti-phospho-mTor der REAL<sup>TM</sup> Kit

Streptavidin/Alkalische Phosphatase verwendet wurde. Erläuterungen zum genauen Färbeablauf folgen in den Abschnitten 3.2.3.2 und 3.2.3.5.

### **3.2.3.1. Herstellung der Pufferlösungen**

#### **♦ TBS-T Waschpuffer**

Für einen Liter zehnfach konzentrierter Tris gepufferter Kochsalzlösung (TBS) wurden 24,2g TRIZMA®Base mit 80g Natriumchlorid und ein Liter Aqua bidest gemischt. Der Ziel-pH-Wert von 7,6 wurde mittels titrierter Zugabe von Salzsäure erreicht. Die zehnfach konzentrierte TBS-Lösung wurde für die Verwendung als Waschpuffer im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Dabei wurden für einen Liter zu 900ml destilliertem Wasser 100ml 10xTBS gegeben und abschließend 1 ml Tween20 hinzugefügt.

#### **♦ Tris-EDTA Puffer**

Zur Herstellung von einem Liter Tris-EDTA Puffer für die Hitzeinduzierte Epitop Retrieval- (HIER-) Demaskierung wurden 1,21g TRIZMA®Base, 0,37g EDTA und ein Liter destilliertes Wasser gemischt. Die pH-Wert-Einstellung bei 9,0 wurde kontrolliert und bei Bedarf mit Salzsäure korrigiert. Nach Zugabe von 0,5ml 0,05%Tween 20 wurde der Puffer gut gemischt und konnte für drei Monate bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

### **3.2.3.2. Immunhistochemische Färbung mit Peroxidase/DAB+**

#### **3.2.3.2.1. Biochemischer Hintergrund**

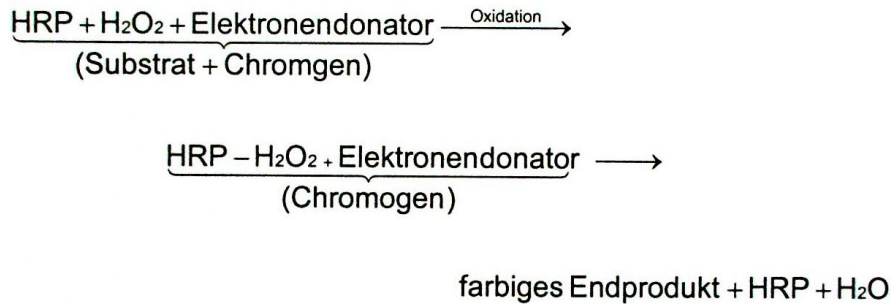
Bevor mit der immunhistochemischen Färbung begonnen werden kann, müssen die Antigenbindungsstellen für die Antikörper zugänglich gemacht werden. Mit Hilfe der Xylol-Aceton-Reihe erfolgt die Entparaffinierung der paraffinfixierten Gewebeschnitte. Dennoch kann der primäre Antikörper danach noch nicht binden. Durch die Paraffinfixierung kommt es zum Verlust der Immunreaktivität des Gewebes, da eine Quervernetzung der Proteine im Gewebe erfolgt. Die Epitope verlieren so ihre Fähigkeit zur Antikörperbindung, was man als Maskierung bezeichnet. Mittels der

hitzeinduzierte Epitopdemaskierung werden die Quervernetzungen gelöst und die Epitope wieder für die Antikörper zugänglich gemacht. Der duale endogene Enzymblock dient der Reduktion der Hintergrundfärbung. Er wird mit Duale-Endogene-Enzym-Blockierungslösung (DEEB) von DAKO durchgeführt. Hierbei wird die Aktivität der Peroxidase und Pseudoperoxidase, die in Hämoglobin, Myoglobin, Cytochromen und Katalase vorkommen, sowie die in neutrophilen Granulozyten vorkommende alkalische Phosphatase inhibiert (Osterwalder 2009).

Die eigentliche immunhistochemische Färbung beginnt mit der Zugabe des primären Antikörpers, in unserem Fall Anti-pan Ras-, Anti-Raf-B-, Anti-p-Erk1/2- oder Anti-Akt-AK. Die primären Maus- bzw. Kaninchenantikörper binden an ihr entsprechendes Antigen im Gewebe. Zur Gewährleistung einer optimalen Antigen-Antikörper-Reaktion wird hierfür eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur eingehalten. Um das am Ende der immunhistochemischen Färbung entstehende Farbsignal zu intensivieren wird vor Zugabe des sekundären Antikörpers ein Maus- bzw. Kaninchen-Linker auf die Gewebeschnitte aufgebracht.

Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Dieser besteht aus einem Dextran Grundgerüst, an das bis zu 100 Meerschweinchen-Peroxidase-(HRP-) Moleküle und bis zu 20 sekundäre Ziegenantikörper-Moleküle konjugiert sind. Der sekundäre Ziegenantikörper hat eine gute Affinität zu den Kaninchen- und Maus-Primär-antikörpern, sodass er mit den verwendeten Primärantikörpern an deren konstanten Teil eine Bindung eingeht. Für eine optimale Bindung wird hier eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur eingehalten.

Zum Abschluss der immunhistochemischen Färbung wird das Farbsubstrat auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Dieses besteht aus einer konzentrierten Diaminobenzidinlösung (DAB+-Lösung), die 1:50 in wasserstoffperoxidhaltigem Substratpuffer verdünnt wurde. Das Farbsubstrat reagiert mit den Peroxidasemolekülen am Dextrangrundgerüst und es entsteht ein brauner Farbumschlag, der das gesuchte Antigen mikro- und makroskopisch sichtbar macht. Die ablaufende Farbreaktion wird in Abbildung 4 im Detail dargestellt.



**Abb. 4: DAB+-Farbsubstratreaktion nach (Osterwalder 2009)**

Mit Zugabe des Farbsubstrates auf die Gewebeschnitte kommt es zur Reaktion von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) aus dem Substratpuffer mit der Peroxidase (HRP) am Dextrangrundgerüst und dem Diaminobenzidin-Chromogen, das zum braunen Endprodukt umgewandelt wird.

### 3.2.3.2.2. Hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung und Duale-Endogene-Enzym-Blockierung

Nachdem die Tumorschnittpräparate im letzten Arbeitsschritt entparaffiniert worden, erfolgte die Hitze-Induzierte-Epitop-Retrieval-Demaskierung (HIER-Demaskierung) mit TRIS-EDTA-Puffer, pH 9 (Herstellung siehe 3.2.3.1). Die mit der Demaskierungslösung gefüllten Objektträgerküvetten wurden schrittweise in der Mikrowelle erhitzt, ohne sie zum Kochen zu bringen, wobei dieser Schritt bei den Astrozytomen aufgrund der Gewebesensibilität mit besonderer Vorsicht durchgeführt wurde. Nachdem die Schnitte 30 Minuten im Kühlschrank bei  $4^\circ\text{C}$  gekühlt wurden, wurden sie gründlich in 1xTBS-T, das wie unter 3.2.3.1. beschrieben hergestellt wurde, gespült.

Im Anschluss erfolgte die Duale-Endogene-Enzymblockierung. Die Schnitte wurden dafür in die Färbekammer gelegt und mit 100 $\mu\text{l}$  Endogener Blockierungslösung benetzt. Wichtig war es hierbei zügig zu arbeiten, da die Gewebeschnitte während des gesamten Färbevorgangs nicht austrocknen durften. Nach einer fünfminütigen Inkubation mit der Blockierungslösung wurden die Schnitte erneut zehn Minuten in 1xTBS-T gründlich gewaschen.

### **3.2.3.2.3 Inkubation mit dem primären Antikörper**

Während die Tumorschnitte zehn Minuten in 1xTBS-T gewaschen wurden, erfolgte die Verdünnung des primären Antikörpers. Hierzu wurden die Anti-pan Ras- und Anti-Raf-B-Primärantikörper mit der Antikörperversdünnungslösung im Verhältnis von 1:400 gemischt, die Anti-p-Erk1/2- und Anti-Akt- Primärantikörper in einem Verhältnis von 1:500.

Für die folgende Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Objektträger in der Färbekammer mit jeweils 100µl des primären Antikörpers benetzt, mit einem Deckgläschen abgedeckt und zwei Stunden bei Raumtemperatur streng waagrecht stehen gelassen.

### **3.2.3.2.4. Inkubation mit dem sekundären Antikörper und Farbreaktion**

Nachdem die mit dem Primärantikörper inkubierten Tumorschnitte erneut für zehn Minuten in 1xTBS-T gewaschen wurden, folgte die 15minütige Inkubation mit jeweils 100µl Linker-Protein in der Feuchtkammer. Hierbei wurde für die mit Anti-pan Ras-Primärantikörper inkubierten Schnitte ein Linker mit Maus-Antikörper, für die restlichen verwendeten Primärantikörper ein Linker mit Kaninchen-Antikörper verwendet.

Alle nun folgenden Reagenzien für die Inkubation mit dem sekundären Antikörper und Farbsubstrat wurden dem REAL™ EnVision™ Detection Kit (K5007) der Firma DAKO Diagnostika entnommen. Nach erneutem Waschen in 1xTBS-T erfolgte die 30minütige Inkubation mit jeweils 100µl des sekundären Antikörpers in der Färbekammer. Darauffolgend wurden die Schnitte erneut zehn Minuten in 1xTBS-T gewaschen und währenddessen das Farbsubstrat vorbereitet. Dabei wurde ein Teil (20µl) DAB+ Chromogen zu 50 Teilen (1000µl) Substratpuffer zugegeben. Die entstandene Farbsubstratlösung wurde gut gemischt und zu jeweils 100µl auf die Objektträger verteilt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Farbsubstratlösung innerhalb von fünf Tagen verbraucht und bei 2-8°C gelagert wird, da das instabile Chromogen sonst aus der Lösung ausfällt. Aus diesem Grund wurde immer nur so viel Farbsubstratlösung hergestellt, wie für die aktuelle Färbung benötigt wurde. Nach drei Minuten Inkubationszeit wurden die Schnitte in 1xTBS-T gespült und die



Inkubation mit dem Farbsubstrat wiederholt. Zum Abschluss der immunhistochemischen Färbung wurden die Schnitte noch einmal in 1xTBS-T gespült.

#### **3.2.3.2.5. Die Hämatoxylin Färbung**

Die Hämatoxylin Färbung dient der Darstellung des nicht spezifisch angefärbten Gewebes im Hintergrund und sorgt so für eine bessere optische Auswertbarkeit, da sich der Farbunterschied zwischen den immunhistochemisch positiven Arealen und dem menschlichen Auge deutlicher darstellen lässt. Bei der Wahl der Methode muss darauf geachtet werden, dass sich die Reagenzien der immunhistochemischen Färbung und der Gegenfärbung vertragen. So darf beispielsweise für alkohollösliche Chromogene wie das verwendete DAB+ keine alkoholhaltige Gegenfärbung verwendet werden. Somit fiel die Wahl auf die Hämatoxylin Färbung, eine oft verwendete Standardfärbemethode. Bei dieser bindet der saure Farbstoff Hämalan an basische Gruppen der Gewebe wie beispielsweise DNA. Zellkerne, das raue Endoplasmatische Retikulum und freie Ribosomen werden so blau angefärbt.

Für die Gegenfärbung wurden die Objektträger nach Abschluss der immunhistochemischen Färbung für fünf Minuten in eine mit Hämatoxylin-Lösung gefüllte Färbekammer gestellt und im Anschluss in einem Objektträgerhalter für zehn Minuten mit Leitungswasser gespült.

Nach dem Beenden der Gegenfärbung wurden die gefärbten Tumorschnittpräparate mittels Aquatex®-Eindecklösung und Deckgläschen der Größe 24x60mm abgedeckt.

#### **3.2.3.3. Die immunhistochemische Färbung mittels Streptavidin/Alkalische Phosphatase**

##### **3.2.3.3.1. Biochemischer Hintergrund**

Die mit Hilfe des Dako REAL™ Detection Kit durchgeführte Färbung entspricht einer indirekten Färbemethode, die als Labeled Strept-Avidin-Biotin-Methode bezeichnet wird. Zu Beginn wird die zweistündige Inkubation mit den monoklonalen primären Kaninchenantikörpern Anti-mTor und Anti-phospho-mTor durchgeführt, in der es zur Bindung der primären Antikörper an ihre antigene Determinante kommt.

Der darauffolgend hinzugegebene sekundäre Antikörper, der gleich gut an Maus- und Kaninchenprimärantikörpern bindet, wird bei dieser Färbemethode mit Hilfe eines Spacerarms aus sieben Atomen mit Biotin markiert, was die Empfindlichkeit des Detektionssystems deutlich erhöht. So ist es möglich, dass jedes biotinylierte Antikörpermolekül mehrere mit alkalischer Phosphatase konjugierte Streptavidin-Moleküle, die mit Lösung B zugegeben werden, bindet (Arbeitsanweisung Dako REAL™). Die gebundene alkalische Phosphatase setzt das abschließend hinzugegebene Chromogen, bei dem es sich um ein Fast Red Chromogen handelt, schließlich an der Antikörperbindungsstelle in ein kontrastreiches rotes Endprodukt um.

### **3.2.3.3.2 Durchführung der immunhistochemische Färbung**

Auch der immunhistochemischen Färbung der Tumorschnittpräparate mit Streptavidin/Alkalische Phosphatase ging die Entparaffinierung der Schnitte voraus (vgl. 3.2.3.2.1.). Analog zur immunhistochemischen Färbung mit Hilfe des DAB+-Chromogens folgte auch bei dieser Färbung die hitzeinduzierte Epitop-Demaskierung (Details siehe 3.2.3.2.2.). Nachdem die Schnitte 30 Minuten im Kühlschrank bei 4°C ausgekühlt waren, wurden sie auch hier für zehn Minuten in 1xTBS-T gewaschen. Währenddessen wurden die primären Antikörper Anti-mTor und Anti-phospho-mTor mit der Antikörperversdünnungslösung im Verhältnis von 1:200 verdünnt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit jeweils 100µl Primärantikörper in der Feuchtkammer. Die Gewebeschnitte wurden abgedeckt und für zwei Stunden streng waagrecht bei Raumtemperatur liegen gelassen.

Die im Folgenden genannten Reagenzien wurden dem REAL™ Detection Kit (K5005) der Firma DAKO Diagnostika entnommen. Nach Ablauf der zweistündigen Inkubation wurden die Schnitte erneut zehn Minuten in 1xTBS-T gewaschen und danach in der Färbekammer mit je 100µl des biotinylierten Sekundärantikörpers benetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein weiterer zehnminütiger Waschschriff in 1xTBS-T. Auf die danach wieder in die Feuchtkammer gelegten Objektträger wurden 100µl an Alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin gegeben und dieses erneut für 30 Minuten inkubiert. Nachdem die Schnitte erneut zehn Minuten in 1xTBS-T gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit dem Farbsubstrat, das während des Waschschriffes frisch hergestellt und danach zügig

aufgetragen wurde, da es aufgrund seiner Instabilität innerhalb von 20 Minuten zu verbrauchen war. Zur Herstellung des Farbsubstrates wurden jeweils ein Teil (30µl) Chromogen Red 1, ein Teil (30µl) Chromogen Red 2 und ein Teil (30µl) Chromogen Red 3 zu 25 Teilen (750µl) Alkalische Phosphatase Substrat Puffer zugegeben und gut gemischt.

Im Anschluss wurden je 100µl der hergestellten Farbsubstratlösung in der Feuchtkammer auf die Objektträger gegeben und für sieben Minuten inkubiert. Zum Abschluss der immunhistochemischen Färbung mit Streptavidin/Alkalische Phosphatase wurden die Schnitte noch einmal in 1xTBS-T gespült, um die Farb-reaktion abzustoppen und die siebenminütige Inkubation mit dem Farbsubstrat, sowie die Spülung mit 1xTBS-T wiederholt.

Zum Schutz der nun gefärbten Gewebeschnitte wurden diese mit Deckgläschen abgedeckt, die mit drei Tropfen Aquatex® Eindecklösung möglichst frei von Luftblasen fixiert wurden.

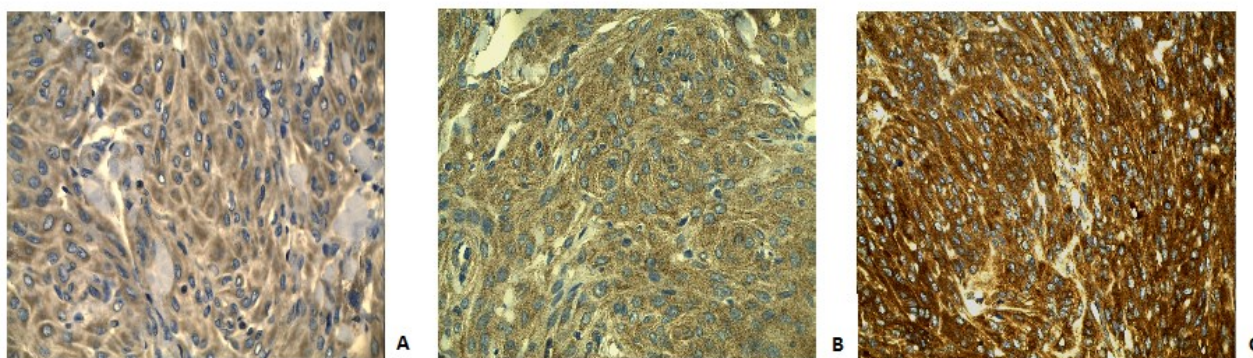
### **3.3. Mikroskopische und statistische Auswertung**

Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumorschnitte erfolgte durch lichtmikroskopische Auswertung. Hierbei wurden die gefärbten Areale subjektiv hinsichtlich der Lokalisation der Färbung und der Farbintensität beurteilt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mittels Lichtmikroskop, das eine 10- bis 400fache Vergrößerung der Gewebe ermöglichte.

Die Farbintensität wurde in vier Farbstärken eingeschätzt und diesen jeweils ein Zahlenwert zugeordnet. Diese immunhistochemischen Farbreaktionsstärken waren negativ (0), leicht und makroskopisch nicht sichtbar (1), moderat (2) und stark (3). Eine negative Färbung lag vor, wenn lediglich blaue Zellkerne als Resultat der Gegenfärbung der Peroxidase/DAB+- bzw. kein Farbumschlag bei der Streptavidin/Alkalische Phosphatase-Färbung zu sehen war.

Zur Einschätzung der Lokalisation der Färbung wurde differenziert, ob sich die Färbung hauptanteilig im Zytoplasma oder im Zellkern befindet. Anschließend wurde subjektiv abgeschätzt wie viel Prozent des Zytoplasmas bzw. wie viele Zellkerne angefärbt waren und dies in einer prozentualen Häufigkeit angegeben. Daraus ergab sich eine vergleichbare Evaluation der Farbverteilung für jeden Antikörper, welche den Anteil der zytoplasmatischen bzw. Zellkernfärbung widerspiegelt.

Mittels der Mikroskopkamera Typ DFC 290 wurden diverse mikroskopische Aufnahmen der Tumorgewebe angefertigt, um die Färbung zu dokumentieren. Abbildung 5 zeigt die verschiedenen Färbestärken einer immunhistochemischen Färbung mit Peroxidase/DAB+.



**Abb. 5: Vergleich der Farbstärken einer Färbung mit Anti-Raf-B**

Die Abbildung zeigt die Fotografien von drei Meningeomen verschiedener Malignitätsgrade (400fache Vergrößerung) mit unterschiedlicher Farbstärke. Hierbei entspricht Bild A einer leichten (1), Bild B einer moderaten (2) und Bild C einer starken (3) Färbung.

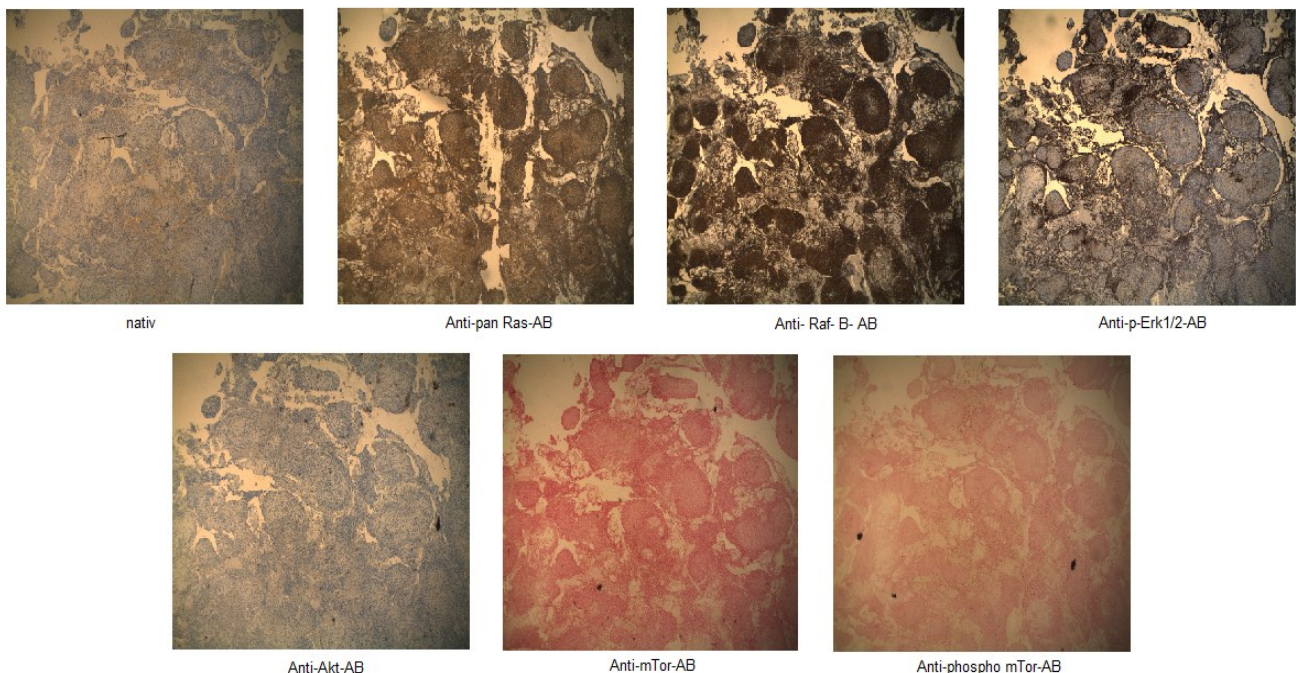
Die statistische Auswertung der lichtmikroskopisch erhobenen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr.-Ing. Heike Hoyer vom Institut für Medizinische Statistik, Informatik und Dokumentation der Universität Jena. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics 21. Es wurde die statistische Signifikanz der untersuchten Zusammenhänge zwischen Tumorgrad und Farbstärke des einzelnen Antikörpers mittels Chi<sup>2</sup>-Test, Kruskal-Wallis-Test und bei Signifikanz des letzteren mittels Mann-Whitney-Test (=U-Test) ermittelt. Da es sich bei den betrachteten Werten um relativ kleine Datenmengen handelte, erfolgte dabei die Betrachtung der exakten Signifikanz, die mittels des Exakten Tests nach Fisher ermittelt wurde. Für eine Bewertung als signifikanter Unterschied musste der ermittelte Wert unter der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,05$  liegen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Mikroskopische Analyse der Tumorgewebe

Bei der mikroskopischen Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Schnittpräparate zeigten sich je nach Tumorart und Tumorgrad unterschiedlich ausgeprägte Farbverteilungen und -stärken. So stellten sich sowohl bei den Meningeomen als auch bei den Astrozytomen intensive hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisierte flächige Farbreaktionen nach Anti-pan Ras-AK und Anti-Raf-B-AK Färbung dar. Die Färbung mit Anti-p-Erk1/2-AK wies sowohl zytoplasmatisch gelegene Färbeergebnisse als auch Anfärbungen der Zellkerne auf. Auffällig dabei war, dass diese Färbungen meist streifig und randständig im Präparat zu finden waren. Nach der Färbung mit Anti-Akt-Antikörper zeigten Meningeome und Astrozytome jeweils kaum sichtbare Farbreaktionen. Die Anti-mTor-AK und Anti-phospho-mTor-AK Färbungen resultierten in guten Färbeergebnisse bei Meningeomen und Astrozytomen, die bei der Anti-phospho-mTor-AK Färbung jedoch geringer ausgeprägt waren. Zur Verdeutlichung der einzelnen Farbreaktionen siehe Abbildung 6.

Im Anschluss folgt die nähere Beschreibung der Färberesultate der einzelnen Antikörper bezogen auf die jeweiligen Tumorgrade, sowie deren statistische Beurteilung.



**Abb. 6: Färbeverhalten der einzelnen Antikörper**

Die Abbildung zeigt das Färbeverhalten eines atypischen Meningeoms (WHO Grad II), Vergrößerung 100x, bei Färbung mit verschiedenen Antikörpern.

#### 4.1.1. Mikroskopische und statistische Analyseergebnisse der Anti-pan Ras-AK Färbung

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Anti-pan Ras-Antikörper wurden elf benigne Meningeome (WHO Grad I), acht atypische Meningeome (WHO Grad II) und acht anaplastische Meningeome (WHO Grad III), sowie 16 pilozytische Astrozytome (WHO Grad I), elf diffuse Astrozytome (WHO Grad II), 15 anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und acht Glioblastome multiforme (WHO Grad IV) betrachtet, die durchweg eine deutliche Farbreaktion aufwiesen. Ras war somit in allen untersuchten Proben exprimiert.

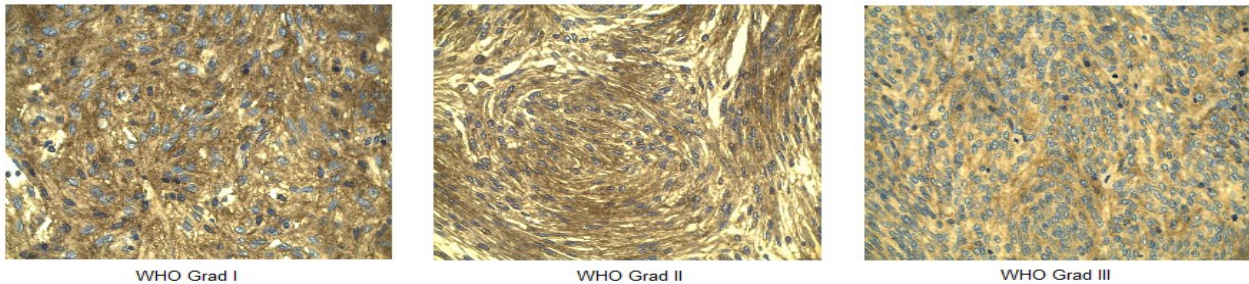
Alle Meningeome zeigten eine rein zytoplasmatisch gelegene Anti-pan Ras-AK Färbung. Das Zellplasma der benignen Meningeome war zu durchschnittlich 46,6% gefärbt, das der atypischen Meningeome zeigte zu 58,8% und das der anaplastischen Meningeome zu 31,3% eine Färbung. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Färbung von 45,5% des Zellplasmas der Meningeome. Abbildung 8 gibt einen grafischen Überblick über die beschriebenen Ergebnisse.

Jeder Tumorgad der Meningeome zeigte ein individuelles Färbeverhalten, welches sich gut in der mittleren Farbstärke der einzelnen Meningeomgrade widerspiegelt. Einen Eindruck von der durchschnittlichen Farbreaktion nach Anti-pan Ras-Antikörperfärbung geben die Fotografien in Abbildung 7. Die benignen Meningeome (WHO Grad I) zeigten mit einer mittleren Farbstärke von 2,1 die stärkste Farbreaktion. Die Färbung war dabei folgendermaßen verteilt: ein Präparat (9,1%) zeigte eine leichte Anfärbung (1), acht Präparate (72,7%) waren moderat (2) und zwei Präparate (18,2%) stark (3) gefärbt. Die atypischen Meningeome (WHO Grad II) zeigten eine mittlere Farbstärke von 1,9; die sich aus folgender Verteilung zusammensetzt: zwei Präparate (25,0%) zeigten eine leichte, fünf (62,5%) eine moderate und eines (12,5%) eine starke Färbung. Mit einer mittleren Farbstärke von 1,5 zeigten die anaplastischen Meningeome (WHO Grad III) die schwächste Farbreaktion der Meningeome nach Anti-pan Ras-AK Färbung. Vier Präparate (50,0%) waren leicht und vier Präparate (50,0%) moderat gefärbt. Tabelle 4 liefert einen Überblick über die erläuterten Ergebnisse.

Die statistische Auswertung der Analyseergebnisse mittels Chi<sup>2</sup>-Test ergab für die Anti-pan Ras-AK Färbung der Meningeome eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p_{\text{exakt}}=0,323$ . Der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Variablen lieferte eine exakte Signifikanz von  $p_{\text{exakt}}=0,085$ . Obwohl die ermittelten Signifikanzen damit über der



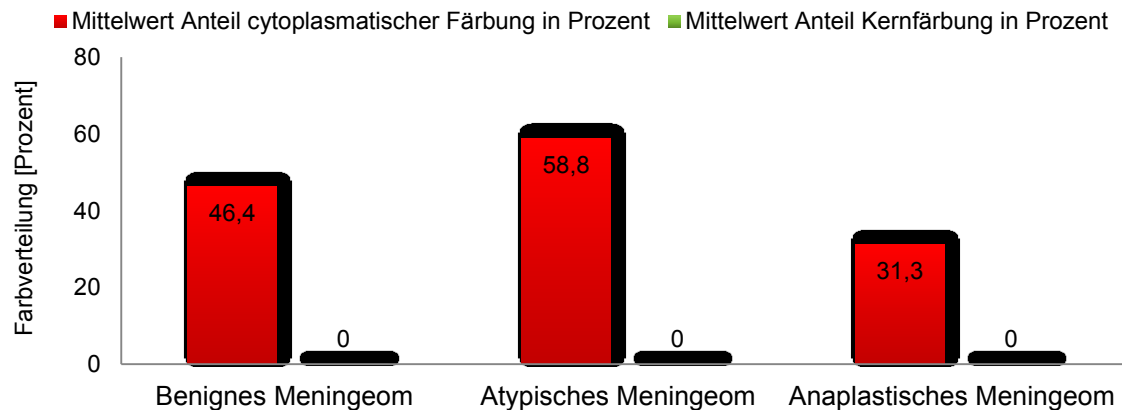
statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,05$  lagen, lassen sich dennoch eindeutige Tendenzen eines Zusammenhanges der mittleren Farbstärke nach Anti-pan Ras-AK Färbung und dem jeweiligen Tumorgrad ableiten, die mittels Abbildung 9 verdeutlicht werden können.



**Abb. 7: Darstellung der Farbreaktion von Meningeomen nach Anti-pan Ras-AK Färbung**

Die Abbildung zeigt die Fotografie dreier Meningeomgrade nach Anti-pan Ras-AK Färbung (400fache Vergrößerung). Sie zeigt, dass mit steigendem WHO-Grad die Farbstärke abnimmt.

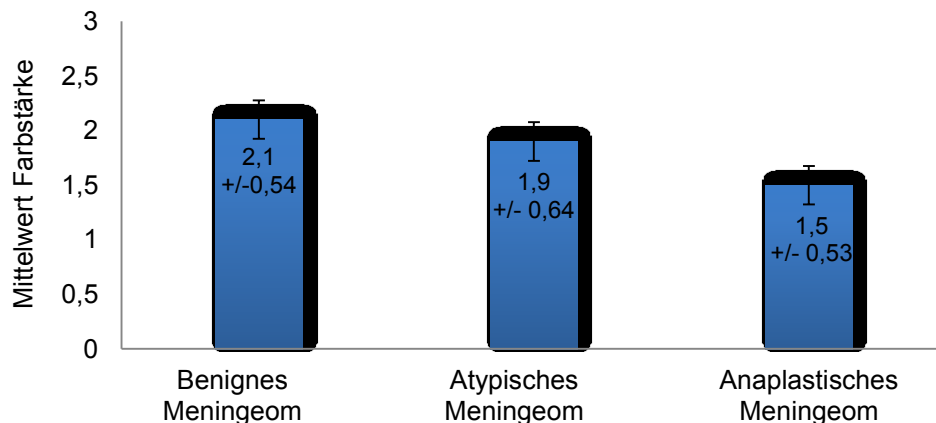
### Darstellung der Farbverteilung



**Abb. 8: Grafik der Farbverteilung von Meningeomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-pan Ras-AK Färbung**

Das Zytoplasma ist mit durchschnittlich 45% deutlich gefärbt. Die Zellkerne weisen keine Färbung auf.

### Mittelwert Farbstärke



**Abb. 9: Überblick über die mittlere Farbstärke von Meningeomen der WHO-Grade I-III nach Anti-pan Ras-AK Färbung**

Der Abfall der Farbintensität über die drei Grade ist deutlich erkennbar, wenn auch nicht statistisch signifikant.

**Tabelle 4: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-pan Ras-AK Färbung bei Meningeomen**

Die Tabelle fasst die Analyseergebnisse für Meningeome nach Anti-pan Ras-AK Färbung zusammen. Im oberen Tabellenabschnitt wird die Farbstärke, im unteren die Farbverteilung betrachtet.

			Benignes Meningeom	Atypisches Meningeom	Anaplastisches Meningeom	Gesamt
Farbstärke	keine	Anzahl Prozent	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0
	leicht	Anzahl Prozent	1 9,1	2 25,0	4 50,0	7 25,9
	moderat	Anzahl Prozent	8 72,7	5 62,5	4 50,0	17 63,0
	stark	Anzahl Prozent	2 18,2	1 12,5	0 0,0	3 11,1
Gesamt		Anzahl Prozent	11 100	8 100	8 100	27 100
Farbverteilung in Prozent	Zytoplasma		46,4	58,8	31,3	45,5
	Zellkern		0,0	0,0	0,0	0,0

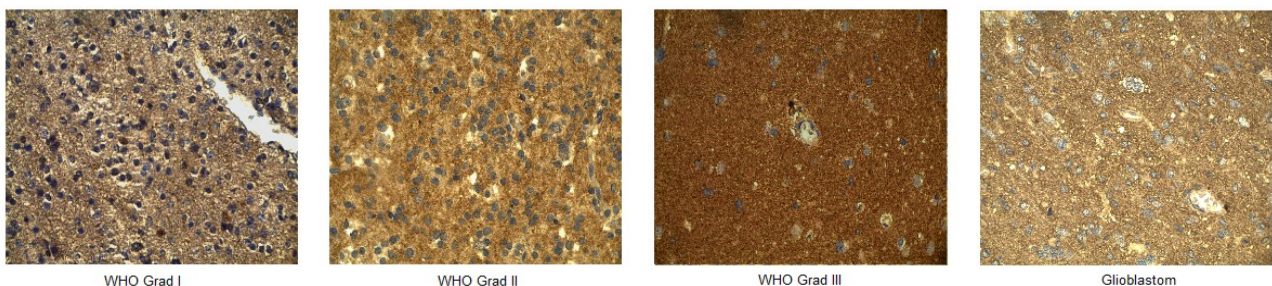
Auch die untersuchten Astrozytome zeigten nach Färbung mit Anti-pan Ras-AK deutliche Farbresultate. Es zeigten sich durchschnittlich 67,4% des Zytoplasmas gefärbt, während die Zellkerne auch hier ungefärbt blieben. Die Zellplasmafärbung verteilte sich dabei wie folgt auf die einzelnen Tumorgade: 59,4% des Zytoplasmas der pilozytischen Astrozytome und 75,5% des Zytoplasmas der diffusen Astrozytome zeigte eine Färbung. Das Zellplasma der anaplastischen Astrozytome war zu 73,3% gefärbt, das der Glioblastome zu 61,3%. Abbildung 11 dient der Verdeutlichung der Farbverteilung der Gliome nach Anti-pan Ras-AK Färbung.

Die mikroskopischen Abbildungen (Abb. 10) zeigen, dass in allen Astrozytomgraden eine intensive Expression von Ras nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-pan Ras-AK zu finden war. Dabei ergab sich bei den pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I) eine mittlere Farbstärke von 2,2; die sich aus folgenden Einzel-farbstärken zusammensetzt: 13 (81,3%) Astrozytome WHO Grad I zeigten eine moderate (2) Färbung und drei (18,7%) eine starke (3) Färbung. Kein Präparat dieses Tumorgades war leicht (1) gefärbt. Mit einer mittleren Farbstärke von 2,4 zeigten die diffusen Astrozytome (WHO Grad II) eine stärkere Färbung als die pilozytischen Astrozytome. Dabei waren bei den Astrozytomen des WHO Grades II sieben Präparate (63,6%) moderat und die restlichen vier Präparate (36,4%) stark gefärbt. Auch hier war kein Präparat mit einer leichten Immunreaktion vertreten. Die 15 anaplastischen Astrozytome (WHO Grad III) zeigten mit einer mittleren Farbstärke

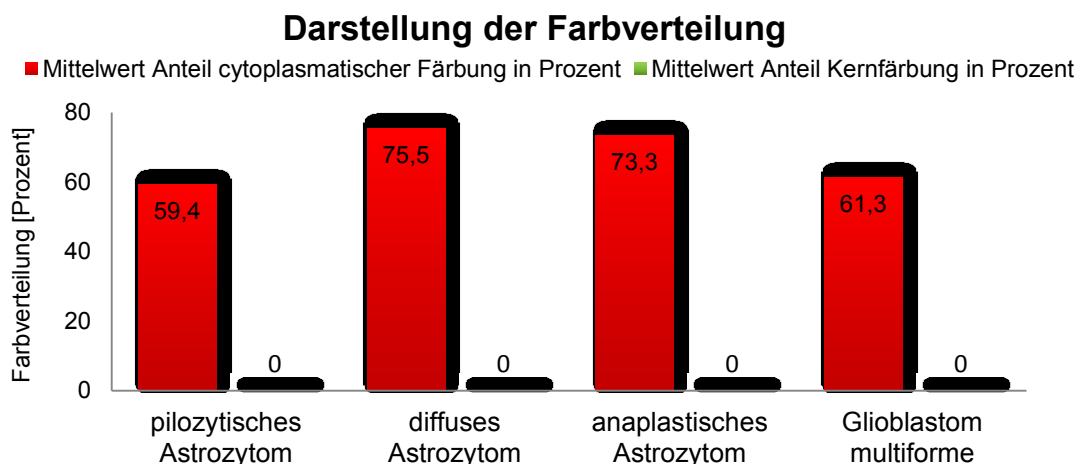


von 2,5 die stärkste Farbreaktion nach Anti-pan Ras-AK Färbung. Dabei war lediglich ein Gliompräparat (6,7%) leicht gefärbt, fünf Gliome (33,3%) zeigten eine moderate und neun (60,0%) eine starke Färbung. Die Glioblastome (WHO Grad IV) zeigten eine deutliche Färbung, die im Mittel eine Farbstärke von 2,0 ergab. Von den acht mit Anti-pan Ras-Antikörper gefärbten Glioblastomen zeigten jeweils eines (12,5%) eine leichte bzw. starke Färbung und sechs Präparate (75,0%) eine moderate Färbung. Zusammenfassend sind in Abbildung 12 die mittleren Farbstärken der Astrozytome grafisch dargestellt. Tabelle 5 gibt zusammenfassend die mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-pan Ras-AK Färbung wider.

In der statistischen Auswertung mittels Chi<sup>2</sup>-Test zeigte sich eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p_{\text{exakt}}=0,045$ . Zwischen der mittleren Farbstärke des Astrozytoms nach Anti-pan Ras-AK Färbung und dem Tumorgad besteht also ein statistischer Zusammenhang. Dieser ließ sich mittels Kruskal-Wallis-Test jedoch nicht bestätigen, die ermittelte exakte Signifikanz lag bei  $p_{\text{exakt}}=0,085$ .

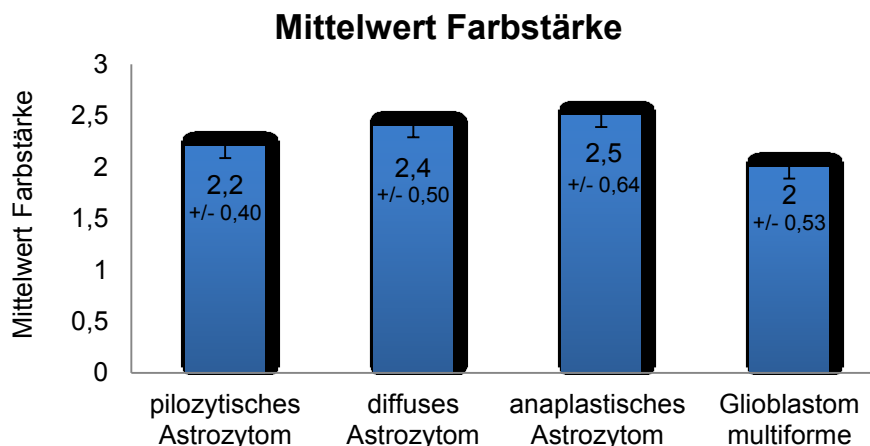


**Abb. 10: Darstellung der Farbreaktionen von Astrozytomen nach Anti-pan Ras-AK Färbung**  
Die Abbildung zeigt die Fotografie von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade in 400facher Vergrößerung. Alle Tumorgade zeigen nach Anti-pan Ras-AK eine starke Farbreaktion.



**Abb. 11: Farbverteilung verschiedener Astrozytom WHO-Grade nach Anti-pan Ras-AK Färbung**

Die Färbung mit Anti-pan Ras-Antikörper ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert und färbt dieses zu durchschnittlich 67,0% an.



**Abb. 12: Grafik der mittleren Farbstärke von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-pan Ras-AK Färbung**

Die Astrozytome zeigen nach dieser Färbung durchgehend ein intensives Färbeergebnis, jedoch ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen WHO-Graden.

**Tabelle 5: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-pan Ras-AK Färbung bei Astrozytomen**

Die Tabelle fasst die Auswertungsergebnisse von Astrozytomen nach Anti-pan Ras-AK Färbung zusammen. Dabei wird im oberen Tabellenabschnitt die Farbstärke und im unteren die Farbverteilung betrachtet.

			Pilozytisches Astrozytom	Diffuses Astrozytom	Anaplastisches Astrozytom	Glioblastom multiforme	Gesamt
Farbstärke	keine	Anzahl Prozent	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0
	leicht	Anzahl Prozent	0 0,0	0 0,0	1 6,7	1 12,5	2 4,0
	moderat	Anzahl Prozent	13 81,3	7 63,6	5 33,3	6 75,0	31 62,0
	stark	Anzahl Prozent	3 18,7	4 36,4	9 60,0	1 12,5	17 34,0
Gesamt		Anzahl Prozent	16 100	11 100	15 100	8 100	50 100
Farb- verteilung in Prozent	Zytoplasma		59,4	75,5	73,3	61,3	67,4
	Zellkern		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

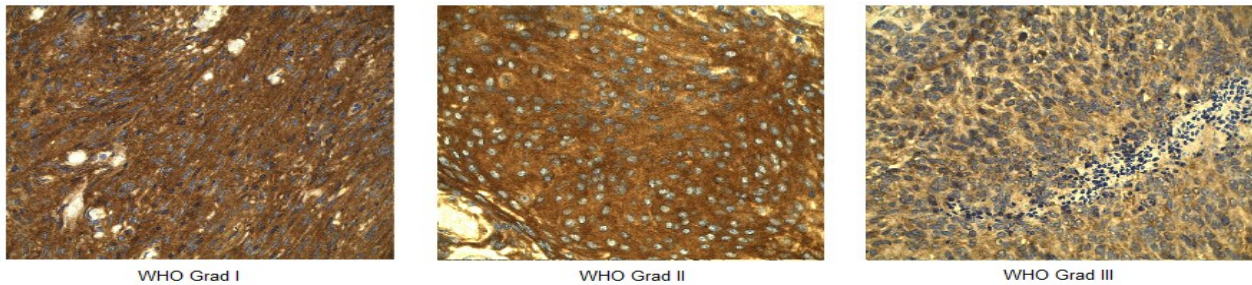
#### 4.1.2. Die Analyseergebnisse der Färbung mit Anti-Raf-B-Antikörper

Die Analyse der Anti-Raf-B-AK Färbung umfasste 76 Tumorpräparate, die sich wie folgt aufteilen: elf benigne Meningeome (WHO Grad I), acht atypische Meningeome (WHO Grad II), acht anaplastische Meningeome (WHO Grad III); 16 pilozytische Astrozytome (WHO Grad I), elf diffuse Astrozytome (WHO Grad II), 14 anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und acht Glioblastome multiforme (WHO Grad IV).

Die Anti-Raf-B-AK Färbung stellte sich bei den Meningeomen in Form einer rein zytoplasmatischen Färbung dar. Die Verteilung dieser Färbung wird in Abbildung 14 grafisch veranschaulicht. Die Färbung mit Anti-Raf-B-Antikörper nahm dabei durchschnittlich 42,2% des Zytoplasmas der gefärbten Tumorpräparate ein. Es zeigt sich somit eine deutliche Expression von Raf-B in Meningeomen. Betrachtet man die einzelnen Meningeomgrade, so zeigte sich das Zellplasma der benignen Meningeome zu durchschnittlich 37,7% gefärbt, das der atypischen Meningeome zu 53,8% und das der anaplastischen zu 35,0%. Eine Zellkernfärbung war in keinem der Tumorpräparate zu finden.

Nach Anti-Raf-B-AK Färbung zeigten die Meningeome ein ähnliches Färbeverhalten wie nach Anti-pan Ras-AK Färbung, was in Abbildung 13 verdeutlicht wird. Die intensivste Färbung zeigten mit einer mittleren Farbstärke von 2,6 die benignen Meningeome (WHO Grad I). Diese verteilte sich wie folgend aufgelistet unter den Präparaten: 54,5% der Meningeome WHO-Grad I (n=6) zeigten eine starke (3) Färbung, 45,5% (n=5) eine moderate (2) und keines eine leichte (1) Färbung. Eine etwas schwächere Färbung wiesen die atypischen Meningeome (WHO Grad II) auf. Diese zeigten eine mittlere Färbestärke von 2,4. Von den acht betrachteten Meningeomen des WHO Grades II zeigte eines (12,5%) eine leichte Färbung, drei (37,5%) eine moderate Färbung und vier (50,0%) eine starke Färbung. Die schwächste Anfärbung nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-Raf-B-AK zeigten die anaplastischen Meningeome (WHO Grad III). Die mittlere Farbstärke lag bei 2,1. Es zeigten zwei Präparate eine leichte (25,0%) und jeweils drei (37,5%) eine moderate bzw. starke Färbung. Tabelle 6 gibt einen Überblick über alle Analyseergebnisse der immunhistochemischen Färbung.

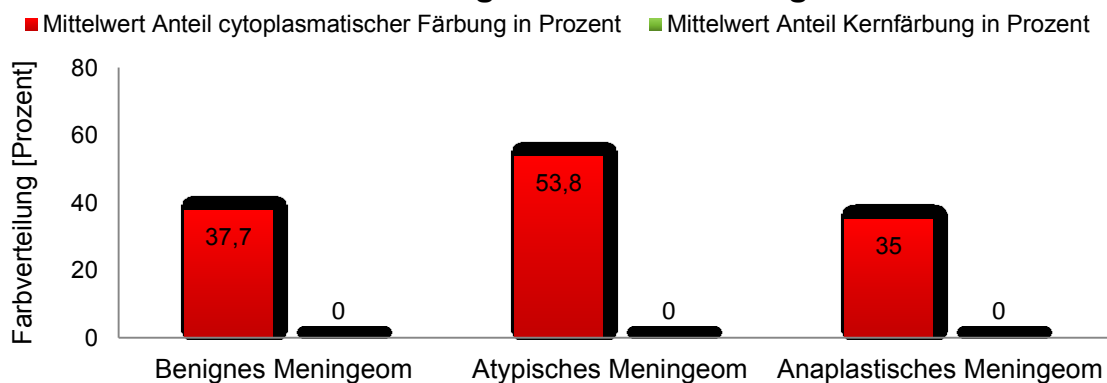
Weder in der statistischen Auswertung mittels Chi<sup>2</sup>-Test ( $p_{\text{exakt}}=0,626$ ), noch in der Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test ( $p_{\text{exakt}}=0,578$ ) zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Färbestärke nach Färbung mit Anti-Raf-B-Antikörper und dem Meningeomtumorgrad. Auch nach dieser AK-Färbung lassen sich jedoch Tendenzen ableiten, die mittels Abbildung 15 verdeutlicht werden können.



**Abb. 13: Darstellung der Farbreaktion von Meningeomen nach Anti-Raf-B-AK Färbung**

Die Abbildung zeigt die mikroskopischen Fotografien von drei Meningeomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-Raf-B-AK Färbung (400x Vergrößerung). Die intensive, mit steigendem WHO-Grad jedoch schwächer werdende Färbung wird durch die Fotografien verdeutlicht.

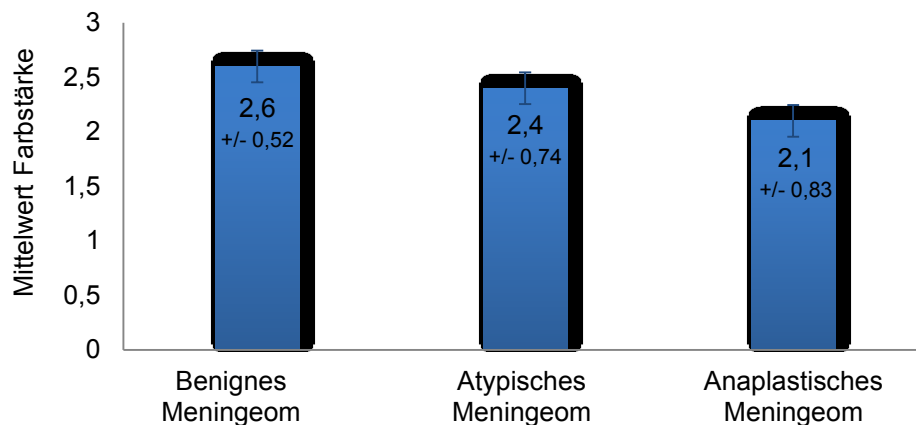
### Darstellung der Farbverteilung



**Abb. 14: Farbverteilung der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Raf-B-AK in Meningeomen verschiedener WHO-Grade**

Die Färbung ist nur zytoplasmatisch zu finden und nimmt im Mittel 42,2% der Meningeome ein.

### Mittelwert Farbstärke



**Abb. 15: Überblick über die mittlere Farbstärke von Meningeomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-Raf-B-AK Färbung**

Dabei wird die intensive Farbreaktion deutlich, die mit steigendem WHO-Grad eine sinkende Intensität zeigt. Eine statistische Signifikanz der Farbergebnisse ist dabei nicht feststellbar.

**Tabelle 6: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-Raf-B-AK Färbung bei Meningeomen**

Die Tabelle fasst die Auswertungsergebnisse der Meningeome nach Anti-Raf-B-AK Färbung zusammen. Im oberen Tabellenabschnitt wird die Farbstärke, im unteren die Farbverteilung betrachtet.

			Benignes Meningeom	Atypisches Meningeom	Anaplastisches Meningeom	Gesamt
Farbstärke	keine	Anzahl <b>Prozent</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>
	leicht	Anzahl <b>Prozent</b>	0 <b>0,0</b>	1 <b>12,5</b>	2 <b>25,0</b>	3 <b>11,1</b>
	moderat	Anzahl <b>Prozent</b>	5 <b>45,5</b>	3 <b>37,5</b>	3 <b>37,5</b>	11 <b>40,7</b>
	stark	Anzahl <b>Prozent</b>	6 <b>54,5</b>	4 <b>50,0</b>	3 <b>37,5</b>	13 <b>48,2</b>
Gesamt		Anzahl <b>Prozent</b>	11 <b>100</b>	8 <b>100</b>	8 <b>100</b>	27 <b>100</b>
Farbverteilung in Prozent	Zytoplasma		37,7	53,8	35,0	42,2
	Zellkern		0	0	0	0

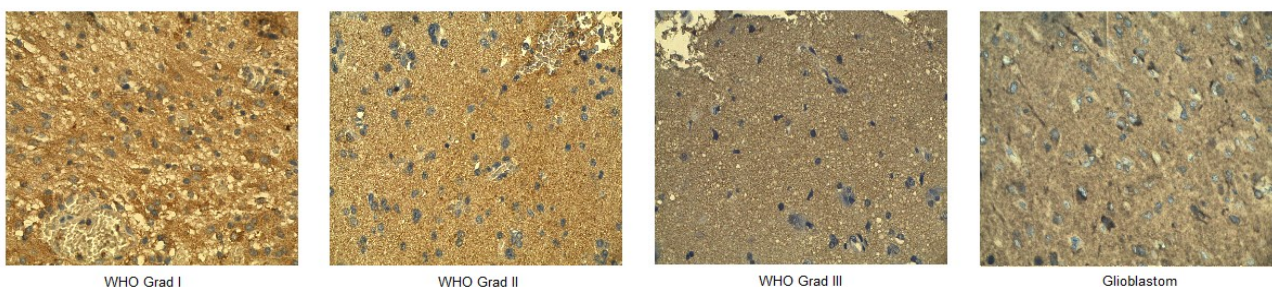
Die immunhistochemische Färbung der Astrozytome mit Anti-Raf-B-Antikörper wies Raf zum größten Teil zytoplasmatisch gelegen nach. Nur ein Präparat der pilozytischen Astrozytome zeigte eine Färbung von 70,0% der Zellkerne des Präparats. Daraus ergibt sich im Mittel eine Kernfärbung von lediglich 1,2% aller Astrozytome nach Anti-Raf-B-AK Färbung. Insgesamt war die Antikörper-Färbung der Astrozytome hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Im Mittel war mit 49,7% gut die Hälfte des Zellplasmas der Präparate gefärbt. Betrachtet man die einzelnen Tumorggrade ergab sich folgende zytoplasmatische Farbverteilung: Das Zellplasma der pilozytischen Astrozytome wies zu 36,6%, das der diffusen Astrozytome zu 62,7% eine Farbreaktion auf. Bei den anaplastischen Astrozytomen zeigten 42,1% des Zellplasmas eine Färbung, bei den Glioblastomen 57,5%. Zusammenfassend ist diese Farbverteilung in Abbildung 17 dargestellt.

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, wiesen die Astrozytompräparate nach Anti-Raf-B-AK Färbung eine sehr intensive Immunreaktion auf, was auf eine hohe Raf-Expression in Gliomen schließen lässt. Dabei lag die mittlere Farbstärke bei den pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I) bei 1,7. Von den 16 betrachteten WHO Grad I- Astrozytomen wiesen acht (50,0%) eine leichte (1) Färbung auf, fünf (31,25%) waren moderat (2) und drei (18,75%) stark (3) gefärbt. Die Anti-Raf-B-AK Färbung zeigte sich bei den diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) mit einer mittleren Farbstärke von 1,4 schwächer ausgeprägt. Sie verteilte sich wie folgt auf die

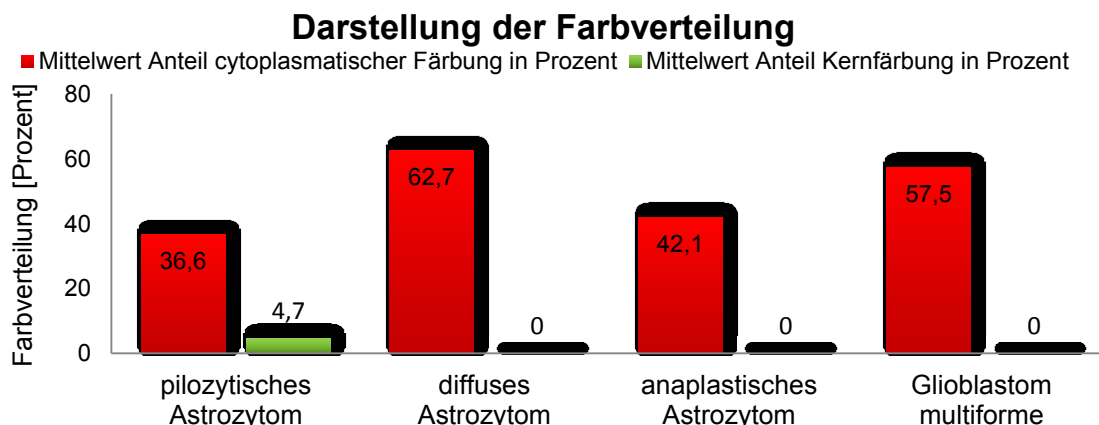


Gliompräparate: jeweils fünf Präparate (45,5%) waren leicht bzw. moderat angefärbt, während keines eine starke Färbung aufwies. Ein Präparat zeigte keine (0) gefärbten Areale (9,0%). Die anaplastischen Astrozytome (WHO Grad III) zeigten eine deutlichere Färbung mit einer mittleren Farbstärke von 2,1. Zwei Gliome (14,3%) waren leicht, acht (57,1%) moderat und vier Gliome (28,6%) stark gefärbt. Bei den Glioblastomen (WHO Grad IV) überwog die moderate Farbstärke. Sieben von acht Glioblastompräparaten zeigten diese Farbstärke (2), was einem prozentualen Anteil von 87,5% entspricht. Ein Präparat (12,5%) zeigte eine starke Farbreaktion. Somit zeigten die Glioblastome mit einer mittleren Farbstärke von 2,1 eine ebenso starke Farbreaktion wie die anaplastischen Astrozytome. Einen Überblick über die mittleren Farbstärken der Astrozytome nach Anti-Raf-B-AK Färbung gibt Abbildung 18. Die Analyseergebnisse der Färbung sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

In der statistischen Auswertung der mit Anti-Raf-B-AK gefärbten Astrozytome zeigte sich mittels Chi<sup>2</sup>-Test bei einem  $P_{\text{exakt}}$ -Wert von 0,027 ein signifikanter Zusammenhang zwischen mittlerer Farbstärke und Tumorgrad. Zwischen Farbstärke und Tumorgrad besteht somit ein statistisch gesicherter Zusammenhang. Diese Unterschiede zwischen den Farbintensitäten der verschiedenen Tumorgrade wurden im Kruskal-Wallis-Test ( $p_{\text{exakt}}=0,023$ ) bestätigt. Im direkten Vergleich mittels Mann-Whitney-Test (U-Test) zeigten sich zwischen den pilozytischen Astrozytomen und den restlichen Gliomgraden keine statistisch signifikanten Unterschiede bzgl. der Farbstärke des Antikörpers. Die Farbstärke von diffusen Astrozytomen zeigte sich sowohl im Vergleich zu anaplastischen Astrozytomen ( $p_{\text{exakt}}=0,014$ ) als auch im Vergleich zu Glioblastomen ( $p_{\text{exakt}}=0,012$ ) signifikant vermindert. Der direkte Vergleich der Farbintensitäten der anaplastischen Astrozytome und der Glioblastome ergab keinen signifikanten Unterschied in der Farbstärke ( $p_{\text{exakt}}=0,798$ ).

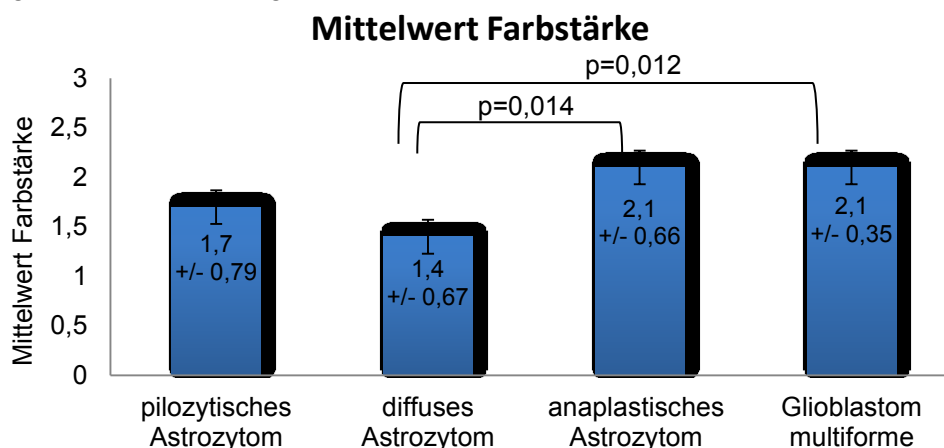


**Abb. 16: Darstellung der Farbreaktionen von Astrozytomen nach Anti-Raf-B-AK Färbung**  
Die Abbildung zeigt die Fotografie von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-Raf-B-AK Färbung in 400facher Vergrößerung. Nach dieser immunhistochemischen Färbung zeigen alle Tumorgrade eine gute Farbreaktion.



**Abb. 17: Verteilung der Farbreaktionen nach Anti-Raf-B-AK Färbung in Astrozytomen verschiedener WHO-Grade**

Die Färbung ist hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert, nur ein pilozytisches Astrozytom-präparat zeigte eine Kernfärbung.



**Abb. 18: Grafik der mittleren Farbstärke von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-Raf-B-AK Färbung**

Alle Gliome zeigen nach dieser Färbung eine durchschnittliche bis intensive Raf-Expression, die in den WHO Graden III und IV signifikant stärker ist als im WHO Grad II.

**Tabelle 7: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-Raf-B-AK Färbung bei Astrozytomen**

Die Tabelle fasst die Auswertungsergebnisse der Astrozytome nach Anti-Raf-B-AK Färbung zusammen. Der obere Tabellenabschnitt zeigt die Farbstärke, der untere die Farbverteilung.

			Pilozytisches Astrozytom	Diffuses Astrozytom	Anaplastisches Astrozytom	Glioblastom multiforme	Gesamt
Farbstärke	negativ	Anzahl Prozent	0 0,0	1 9,0	0 0,0	0 0,0	1 2,0
	leicht	Anzahl Prozent	8 50,0	5 45,5	2 14,3	0 0,0	15 30,6
	moderat	Anzahl Prozent	5 31,3	5 45,5	8 57,1	7 87,5	25 51,0
	stark	Anzahl Prozent	3 18,7	0 0,0	4 28,6	1 12,5	8 16,4
Gesamt		Anzahl Prozent	16 100	11 100	14 100	8 100	49 100
Farb- verteilung in Prozent	Zytoplasma		36,6	62,7	42,1	57,5	49,7
	Zellkern		4,7	0,0	0,0	0,0	1,2

#### 4.1.3. Analyseresultate der Anti-p-Erk1/2-AK Färbung

Die Auswertung der Anti-p-Erk1/2-AK Färbung schloss insgesamt 66 Tumorpräparate ein. Dabei wurden elf benigne Meningeome (WHO Grad I), acht atypische Meningeome (WHO Grad II) und acht anaplastische Meningeome (WHO Grad III), sowie 13 pilozytische Astrozytome (WHO Grad I), zehn diffuse Astrozytome (WHO Grad II), acht anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und acht Glioblastome multiforme (WHO Grad IV) betrachtet. Die Färbung mit Anti-p-Erk1/2-Antikörper lieferte ein, im Vergleich zu den beiden zuvor betrachteten Färbungen, differenziertes Farbeergebnis.

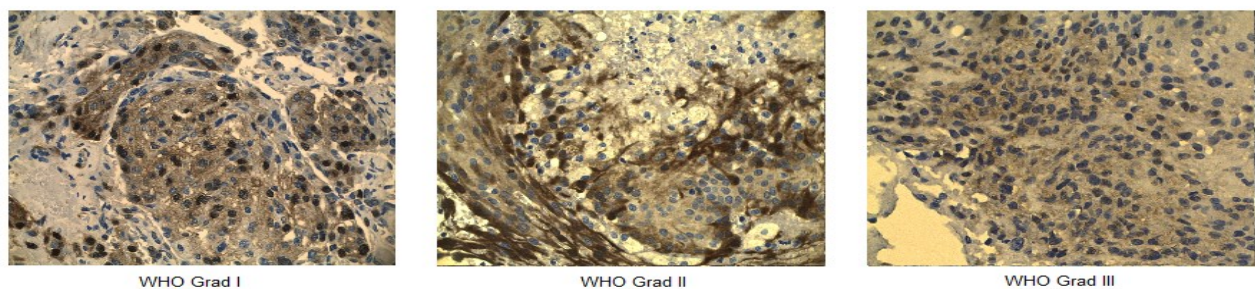
Insgesamt ließ sich p-Erk-1/2 in Meningeomen nach der Färbung weniger stark nachweisen. Im Mittel waren nur 28,4% des Zytoplasmas der Meningeome gefärbt. Dabei stellte sich das Zellplasma der benignen Meningeome durchschnittlich zu 25,9%, das der atypischen Meningeome zu 16,3% gefärbt dar. Mit einem mittleren Farbanteil von 43,1% zeigte das Zytoplasma der anaplastischen Meningeome das größte Färbeausmaß. Neben streifigen, randständigen Zytoplasmafärbungen fanden sich deutliche Anfärbungen der Zellkerne, die in durchschnittlich 21,4% der Kerne zu finden waren. Diese Farbverteilung wird in den Fotografien in Abbildung 19 verdeutlicht. Dabei waren mit durchschnittlich 27,5% bei den atypischen Meningeomen die meisten Kerne gefärbt, gefolgt von den benignen Meningeomen mit 25,6%. Die anaplastischen Meningeome zeigten eine Zellkernfärbung von durchschnittlich 11,3%. Zusammenfassend ist die Farbverteilung der Meningeome nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung in Abbildung 20 dargestellt.

Nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung zeigten die Meningeome in der Regel ein intensives Farbeergebnis, was Abbildung 21 verdeutlicht. Bei den benignen Meningeomen (WHO Grad I) wiesen zwei Tumore (18,2%) eine leichte (1), fünf (45,4%) eine moderate (2) und vier (36,4%) eine starke (3) Färbung auf, was eine mittlere Farbstärke von 2,2 ergibt. Die atypischen Meningeome (WHO Grad II) zeigten mit einer mittleren Farbstärke von 2,6 die intensivste Färbung dieser Tumorart. Von den acht Präparaten zeigten jeweils eines (12,5%) eine leichte bzw. moderate Färbung, während die restlichen sechs (75,0%) stark gefärbt waren. Mit einer mittleren Farbstärke von 1,1 zeigten die anaplastischen Meningeome (WHO Grad III) die schwächste Farbreaktion. Drei Präparate (37,5%) zeigten keine (0), drei Präparate (37,5%) eine leichte und zwei Präparate (25,0%) eine starke Färbung. Alle



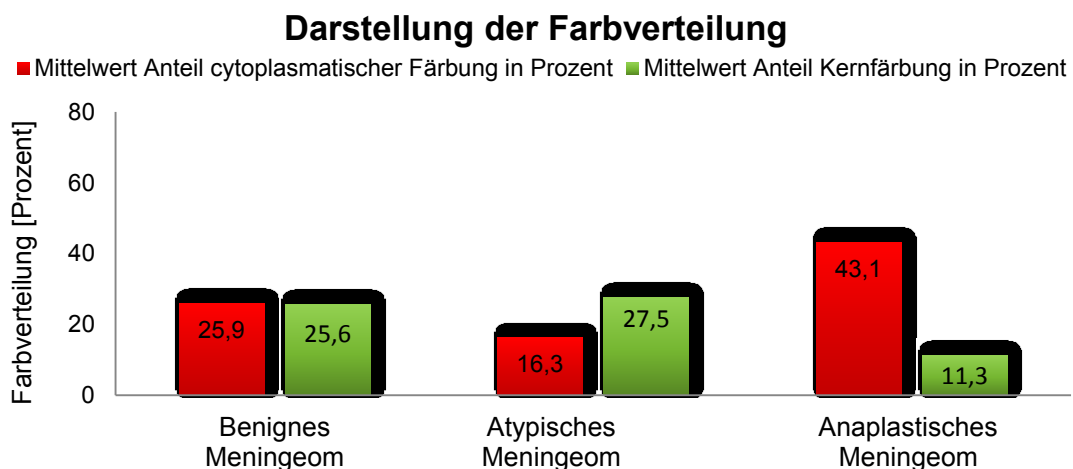
Analyseergebnisse der Meningeome nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Die statistische Untersuchung der Meningeome nach Anti-p-Erk1/2-Antikörper Färbung zeigt im Chi<sup>2</sup>-Test mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p_{\text{exakt}}=0,025$  einen signifikanten Zusammenhang zwischen mittlerer Farbstärke und Tumorggrad. Diese Unterschiede in der Farbintensität zwischen den einzelnen Tumorggraden nach Färbung mit dem Antikörper wurden mittels Kruskal-Wallis-Test bestätigt: Er zeigte mit einem  $p_{\text{exakt}}$ -Wert von 0,022 einen statistisch gesicherten Zusammenhang. Dieser ließ sich im direkten Vergleich der Meningeome mittels Mann-Whitney-Test (U-Test) nur zwischen atypischen und anaplastischen Meningeomen mit einem  $p_{\text{exakt}}$  von 0,028 signifikant bestätigen. Damit zeigten die untersuchten atypischen Meningeome eine signifikant stärkere Expression von p-Erk1/2 als anaplastische Meningeome.



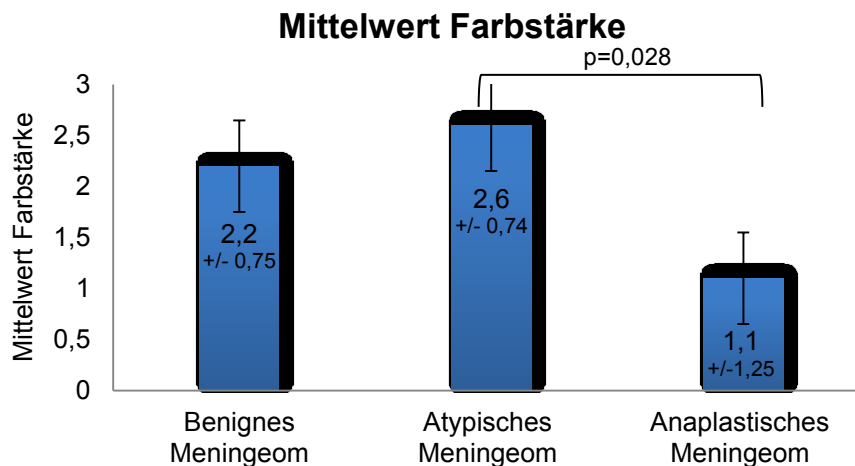
**Abb. 19: Darstellung der Farbreaktionen von Meningeomen nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung**

Die Abbildung zeigt die Fotografie dreier Meningeome (400fache Vergrößerung) verschiedener WHO-Grade nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung. Dabei wird die Verteilung der Färbung auf Zellplasma und Zellkerne verdeutlicht.



**Abb. 20: Farbverteilung von Meningeomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung**

Die Färbung ist in allen WHO-Graden auf Zytoplasma und Zellkerne verteilt.



**Abb. 21: Mittlere Farbstärke von Meningeomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung**

Die benignen und atypischen Meningeome zeigen eine intensivere Färbung als die anaplastischen Meningeome. Die stärkere Expression von p-Erk1/2 in den atypischen im Vergleich zu den anaplastischen Meningeomen ist dabei signifikant.

**Tabelle 8: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-p-Erk1/2-AK Färbung bei Meningeomen**

Die Tabelle fasst die Analyseergebnisse der Meningeome nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung zusammen. Im oberen Tabellenabschnitt wird die Farbstärke und im unteren die Farbverteilung betrachtet.

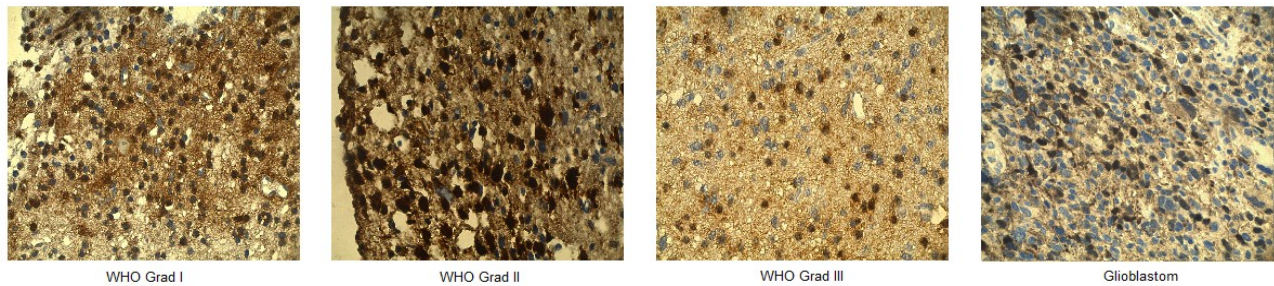
			Benignes Meningeom	Atypisches Meningeom	Anaplastisches Meningeom	Gesamt
Farbstärke	negativ	Anzahl <b>Prozent</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	3 <b>37,5</b>	3 <b>11,1</b>
	leicht	Anzahl <b>Prozent</b>	2 <b>18,2</b>	1 <b>12,5</b>	3 <b>37,5</b>	6 <b>22,2</b>
	moderat	Anzahl <b>Prozent</b>	5 <b>45,4</b>	1 <b>12,5</b>	0 <b>0,0</b>	6 <b>22,2</b>
	stark	Anzahl <b>Prozent</b>	4 <b>36,4</b>	6 <b>75,0</b>	2 <b>25,0</b>	12 <b>44,5</b>
	Gesamt	Anzahl <b>Prozent</b>	11 <b>100</b>	8 <b>100</b>	8 <b>100</b>	27 <b>100</b>
Farbverteilung in Prozent	Zytoplasma		25,9	16,3	43,1	28,4
	Zellkern		25,6	27,5	11,3	21,4

Auch bei den Astrozytomen zeigte sich nach der immunhistochemischen Färbung mit Anti-p-Erk1/2-Antikörper nicht nur eine zytoplasmatische, sondern auch eine Zellkernfärbung. Diese Verteilung der Färbung wird in Abbildung 22 verdeutlicht. Die Färbung stellte sich insgesamt bei den Astrozytomen intensiver dar als bei den Meningeomen. Durchschnittlich zeigten sich bei den Astrozytomen nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung 35,6% des Zytoplasmas und 46,2% der Zellkerne gefärbt. Die pilozytischen

Astrozytome zeigten dabei im Durchschnitt 43,1% ihres Zytoplasmas und 46,2% ihrer Zellkerne gefärbt. Bei den diffusen Astrozytomen stellte sich das Zytoplasma nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung zu 45,5%, die Zellkerne zu 46,0% gefärbt dar. Das Zytoplasma der anaplastischen Astrozytome war zu 30,0% gefärbt, während die Zellkerne auch hier zu 45,0% eine Färbung aufwiesen. Bei den Glioblastomen schließlich zeigte das Zytoplasma nur noch zu 23,8% eine Farbreaktion, die Zellkernfärbung bewegte sich mit 47,5% im Bereich der anderen Gliomgrade. Die Farbverteilung wird in Abbildung 23 noch einmal zusammengefasst.

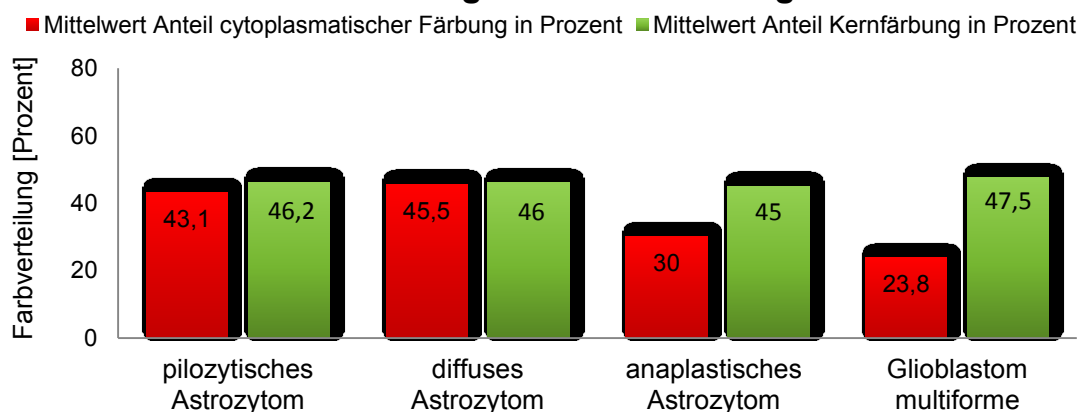
Wie auch die Meningeome zeigten die Astrozytome nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung eine intensive Farbreaktion, die in Abbildung 24 verdeutlicht wird. Die pilozytischen Astrozytome (WHO Grad I) zeigten dabei mit einer mittleren Farbstärke von 2,4 die intensivste Anfärbung. Von den 13 betrachteten WHO Grad I-Astrozytomen zeigte ein Präparat (7,6%) eine leichte (1) Farbreaktion und jeweils sechs Präparate (46,2%) eine moderate (2) bzw. starke (3) Färbung. Bei den diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) zeigten 30,0% (n=3) eine leichte, 10,0% (n=1) eine moderate und 60,0% (n=6) eine starke Färbung, woraus sich eine mittlere Farbstärke von 2,3 ergab. Die Anti-p-Erk1/2-AK Färbung zeigte bei den anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) eine mittlere Farbstärke von 2,0; die sich wie folgt auf die acht Präparate verteilte: Zwei Gliome (25,0%) waren leicht, vier Gliome (50,0%) moderat und zwei Gliome (25,0%) stark gefärbt. Eine ähnlich starke Farbreaktion zeigte sich bei den Glioblastomen (WHO Grad IV): Auch hier zeigten zwei Präparate (25,0%) eine leichte Färbung, vier Präparate (50,0%) eine moderate und zwei Präparate (25,0%) eine starke Färbung, sodass sich auch bei den Glioblastomen eine durchschnittliche Farbstärke von 2,0 ergab. Alle Analyseergebnisse der immunhistochemischen Färbung von Astrozytomen mit Anti-p-Erk1/2-Antikörper sind in Tabelle 9 noch einmal zusammengefasst.

Die statistische Analyse der Färbung der Gliome mit Anti-p-Erk1/2-Antikörper ergab mittels Chi<sup>2</sup>-Test einen  $p_{\text{exakt}}$ -Wert von 0,317, womit sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen mittlerer Farbstärke und Tumorgrad sichern ließ. Auch mittels Kruskal-Wallis-Test ließ sich keine Signifikanz der Unterschiede der Erk-Antikörper-Farbstärke in den Gliomgraden erurieren, der  $p_{\text{exakt}}$ -Wert lag mit 0,55 deutlich über der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05. Trotz fehlender Signifikanz kann man anhand von Abbildung 24 eine Tendenz bezüglich der Farbstärke in den verschiedenen Gliomgraden ableiten.



**Abb. 22: Darstellung der Farbreaktion von Astrozytomen nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung**  
Die Abbildung zeigt die Fotografie von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade in 400facher Vergrößerung nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung. Die Verteilung der Färbung auf Zellplasma und Zellkern, sowie die Intensität der Farbreaktion wird dabei verdeutlicht.

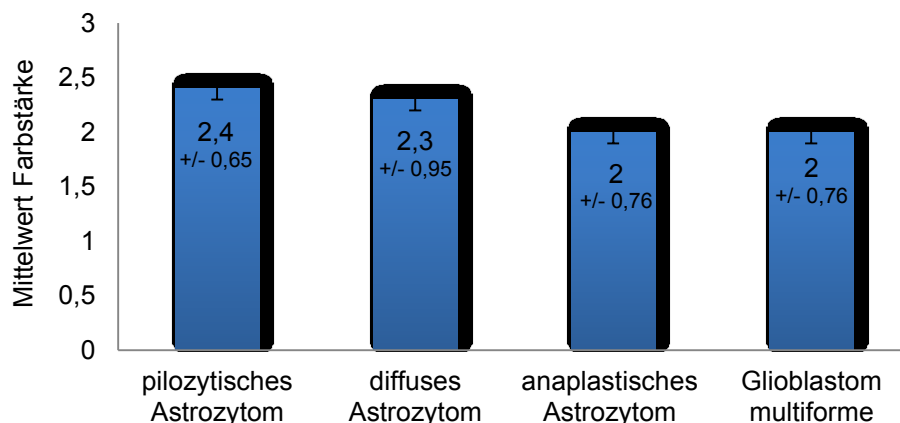
### Darstellung der Farbverteilung



**Abb. 23: Farbverteilung von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung**

Die Färbung verteilt sich dabei relativ gleichmäßig auf Zellplasma und Zellkerne

### Mittelwert Farbstärke



**Abb. 24: Mittlere Farbstärke von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung**

Es wird deutlich, dass in allen vier WHO-Graden eine sehr intensive Färbung nachzuweisen ist, was einer hohen p-Erk1/2-Expression entspricht. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich jedoch zwischen den einzelnen WHO-Graden nicht nachweisen.

**Tabelle 9: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-p-Erk1/2-AK Färbung bei Astrozytomen**

Die Tabelle fasst die Auswertungsergebnisse der Astrozytome nach Anti-p-Erk1/2-AK Färbung zusammen. Der obere Tabellenabschnitt zeigt dabei die Farbstärke und der untere die Farbverteilung.

			Pilozytisches Astrozytom	Diffuses Astrozytom	Anaplastisches Astrozytom	Glioblastom multiforme	Gesamt
Farbstärke	keine	Anzahl <b>Prozent</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>
	leicht	Anzahl <b>Prozent</b>	1 <b>7,6</b>	3 <b>30,0</b>	2 <b>25,0</b>	2 <b>25,0</b>	8 <b>20,5</b>
	moderat	Anzahl <b>Prozent</b>	6 <b>46,2</b>	1 <b>10,0</b>	4 <b>50,0</b>	4 <b>50,0</b>	15 <b>38,5</b>
	stark	Anzahl <b>Prozent</b>	6 <b>46,2</b>	6 <b>60,0</b>	2 <b>25,0</b>	2 <b>25,0</b>	16 <b>41,0</b>
Gesamt		Anzahl <b>Prozent</b>	13 <b>100</b>	10 <b>100</b>	8 <b>100</b>	8 <b>100</b>	39 <b>100</b>
Farbverteilung in Prozent	Zytoplasma		43,1	45,5	30,0	23,8	35,6
	Zellkern		46,2	46,0	45,0	47,5	46,2

#### 4.1.4. Mikroskopische und statistische Analyseergebnisse der Färbung mit Anti-Akt-Antikörper

Die Analyse nach Anti-Akt-Antikörper Färbung schloss 71 Tumorpräparate ein. Betrachtet wurden elf benigne Meningeome (WHO Grad I), acht atypische Meningeome (WHO Grad II), acht anaplastische Meningeome (WHO Grad III), 13 pilozytische Astrozytome (WHO Grad I), zehn diffuse Astrozytome (WHO Grad II), 13 anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und acht Glioblastome multiforme (WHO Grad IV). Im Gegensatz zu den zuvor betrachteten Tumoren zeigte sich nach der Anti-Akt-AK Färbung insgesamt ein sehr schwaches Färbeergebnis.

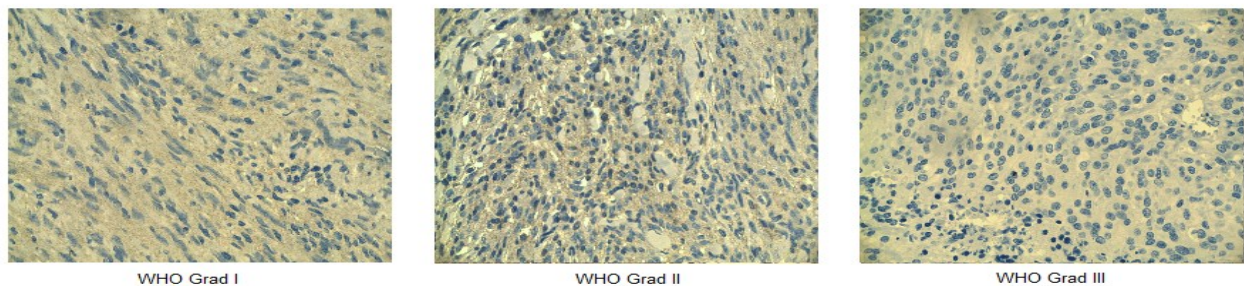
Im Mittel zeigten nur 13,0% des Zytoplasmas der betrachteten Meningeome eine Farbreaktion, die Zellkerne zeigten keine Anfärbung. Die benignen Meningeome wiesen dabei eine durchschnittliche zytoplasmatische Färbung von 20,6% auf, die atypischen Meningeome eine Färbung von 17,5%. Die anaplastischen Meningeome zeigten mit einer Anfärbung von durchschnittlich 0,6% des Zytoplasmas kaum eine Farbreaktion. Diese ausbleibende bis schwache Farbreaktion wird in den Fotografien in Abbildung 25 verdeutlicht. Einen Überblick über die Farbverteilung der Anti-Akt-AK Färbung in Meningeomen gibt auch Abbildung 26.

Nicht nur das Ausmaß der Färbung, sondern auch die Stärke der Farbreaktion war nach Anti-Akt-AK Färbung sehr schwach. Die stärkste Farbreaktion zeigten mit einer mittleren Farbstärke von 1,0 die benignen Meningeome (WHO Grad I). Nur fünf der



elf Präparate zeigten bei diesem Tumorgrad eine Färbung, wobei zwei (36,4%) moderat (2) und eines (9,0%) stark (3) gefärbt waren. Die restlichen sechs Tumorpräparate (54,6%) zeigten keine (0) Färbung mit dem Antikörper. Die atypischen Meningeome (WHO Grad II) zeigten mit einer mittleren Farbstärke von 0,6 ein schwaches Färbeergebnis nach Anti-Akt-AK Färbung. Zwei Präparate (25,0%) zeigten eine moderate und eines (12,5%) eine leichte (1) Färbung, während die restlichen fünf Präparate (62,5%) keine Farbreaktion aufwiesen. Die anaplastischen Meningeome (WHO Grad III) zeigten mit einer mittleren Farbstärke von 0,1 die schwächste Färbung der Anti-Akt-Antikörper Reihe. Nur eines der acht Präparate (12,5%) zeigte eine leichte, nicht makroskopisch sichtbare Färbung, die anderen sieben Präparate (87,5%) blieben ungefärbt. Die schwache Reaktion der Meningeome nach Anti-Akt-AK Färbung verdeutlicht Abbildung 27. Einen zusammenfassenden Überblick zu den beschriebenen Analyseergebnissen gibt Tabelle 10.

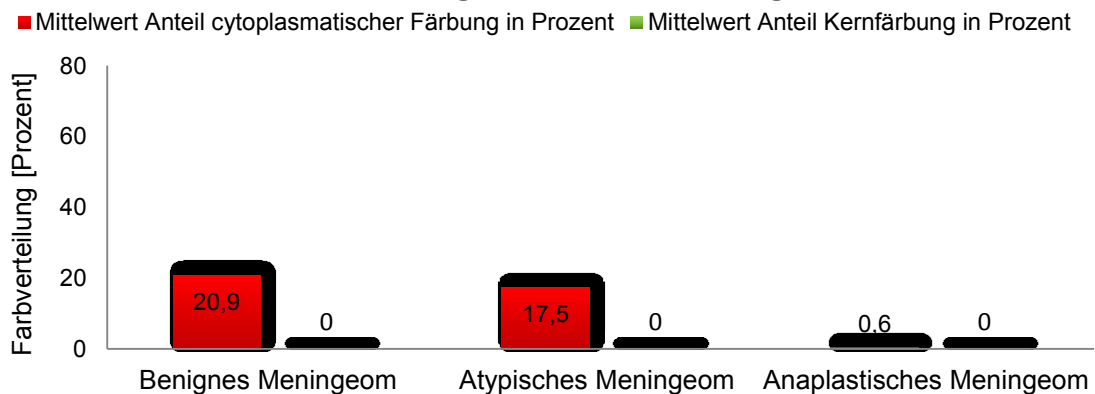
Die statistische Analyse der Farbstärken nach Anti-Akt-AK Färbung mittels Chi<sup>2</sup>-Test und Kruskal-Wallis-Test ergab mit einer Signifikanz von  $p_{\text{exakt}}=0,292$  bzw. 0,196 keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Farbstärke und Tumorgrad.



**Abb. 25: Darstellung der Farbreaktion von Meningeomen nach Anti-Akt-AK Färbung**

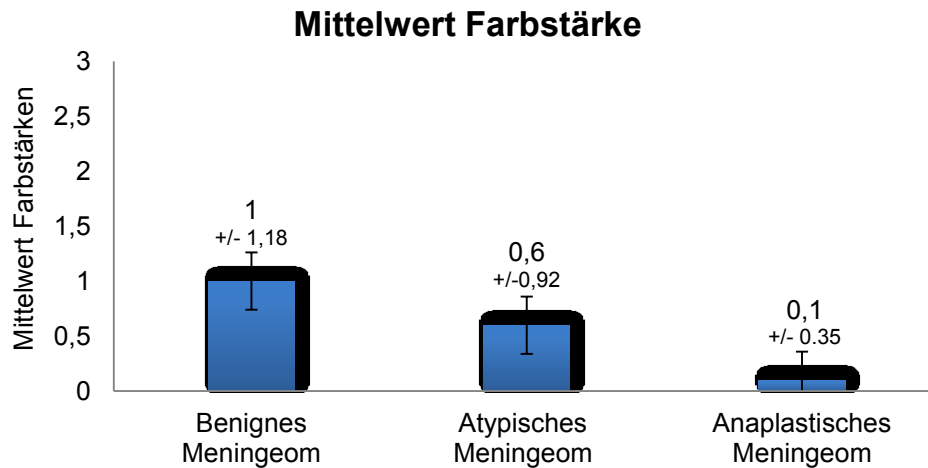
Die Abbildung zeigt die mikroskopischen Fotografien dreier Meningeome verschiedener WHO-Grade nach Anti-Akt-AK Färbung. Alle drei Tumorgrade zeigen kaum eine Farbreaktion.

### Darstellung der Farbverteilung



**Abb. 26: Farbverteilung in Meningeomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-Akt-AK Färbung**

Das Zytoplasma der Meningeome zeigt kaum eine Färbung, die Zellkerne bleiben ungefärbt.



**Abb. 27: Diagramm der mittleren Farbstärke von Meningeomen dreier WHO-Grade nach Anti-Akt-AK Färbung**

Insgesamt zeigt sich Akt nach immunhistochemischer Färbung in Meningeomen nur schwach exprimiert. In höhergradigen Meningeomen ist Akt kaum nachweisbar. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch nicht signifikant darstellen.

**Tabelle 10: Die mikroskopischen Ergebnisse der Anti-Akt-AK Färbung bei Meningeomen**

Die Tabelle fasst die Auswertungsergebnisse der Meningeome nach Anti-Akt-AK Färbung zusammen. Der obere Tabellenabschnitt zeigt die Farbstärke und der untere die Farbverteilung.

			Benignes Meningeom	Atypisches Meningeom	Anaplastisches Meningeom	Gesamt
Farbstärke	negativ	Anzahl Prozent	6 54,6	5 62,5	7 87,5	18 66,7
	leicht	Anzahl Prozent	0 0,0	1 12,5	1 12,5	2 7,4
	moderat	Anzahl Prozent	4 36,4	2 25,0	0 0,0	6 22,2
	stark	Anzahl Prozent	1 9,0	0 0,0	0 0,0	1 3,7
Gesamt		Anzahl Prozent	11 100	8 100	8 100	27 100
Farb- verteilung in Prozent	Zytoplasma		20,9	17,5	0,6	13,0
	Zellkern		0,0	0,0	0,0	0,0

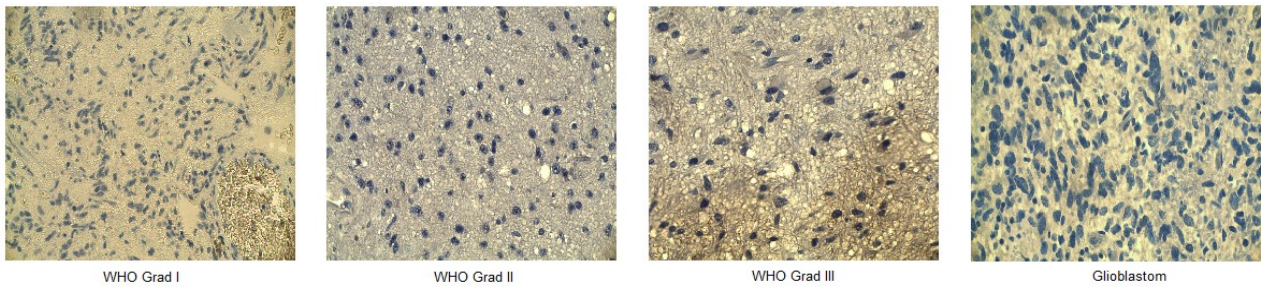
Auch die Färbung der Astrozytome mit Anti-Akt-Antikörper fiel sehr schwach aus. So waren bei den Astrozytomen nach dieser immunhistochemischen Färbung durchschnittlich nur 7,5% des Zytoplasmas gefärbt. Dabei verteilte sich die zytoplasmatische Färbung wie folgt auf die einzelnen Tumorggrade: Bei den pilozytischen Astrozytomen war der Farbeffekt nach Anti-Akt-AK Färbung mit einer durchschnittlichen zytoplasmatischen Farbreaktion von 2,3% sehr schwach. Das Zytoplasma der diffusen Astrozytome zeigte sich im Mittel zu 10,0% gefärbt. Die ausgeprägteste Farbreaktion nach Anti-Akt-AK Färbung zeigten mit einem

zytoplasmatisch gefärbten Anteil von 15,4% die anaplastischen Astrozytome. Die Glioblastome multiforme wiesen mit einem durchschnittlich zytoplasmatisch gefärbten Anteil von 2,5% wiederum kaum eine Färbung auf. Eine Zellkernfärbung war in einem Präparat der anaplastischen Astrozytome zu finden, woraus sich für alle Präparate eine mittlere Zellkernfärbung von 0,4% ergab. Abbildung 29 stellt die Verteilung der Farbreaktion nach Anti-Akt-AK Färbung zusammenfassend dar.

Die Farbstärke der Astrozytome nach Anti-Akt-AK Färbung war insgesamt schwächer als die der Meningeome. Diese geringe Anfärbung wird in der Abbildung 28 verdeutlicht. Bei den pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I) ließ sich keine makroskopisch sichtbare Färbung feststellen. Nur ein Präparat (7,7%) zeigte eine leichte, nur mikroskopisch sichtbare Färbung (1), in allen anderen zwölf Präparaten (92,31%) war kein Farbumschlag (0) erkennbar. Daraus ergab sich für diesen Tumorgrad eine Farbstärke von 0,1. Von den zehn diffusen Astrozytomen (WHO Grad II) zeigten 80,0% (n=8) keine und 20,0% (n=2) eine leichte Färbung, sodass die mittlere Farbstärke bei diesem Tumorgrad bei 0,2 lag. Die anaplastischen Astrozytome (WHO Grad III) zeigten mit einer mittleren Farbintensität von 0,53 die stärkste Farbreaktion unter den Astrozytomen. Von diesem Gliomgrad zeigten sieben Präparate (53,8%) eine leichte Färbung, während die restlichen sechs (46,2%) keine Farbreaktion aufwiesen. Die Glioblastome (WHO Grad IV) zeigten mit einer mittleren Farbstärke von 0,3 ein ähnlich schwaches Farbresultat. Nur zwei der acht Präparate (25,0%) zeigten eine leichte Farbreaktion nach Anti-Akt-AK Färbung, sechs Präparate (75,0%) blieben ungefärbt. Eine zusammenfassende Darstellung der Farbstärke nach Anti-Akt-AK Färbung liefert Abbildung 30. In Tabelle 11 werden alle Analyseergebnisse der Astrozytome nach Anti-Akt-AK Färbung zusammengefasst.

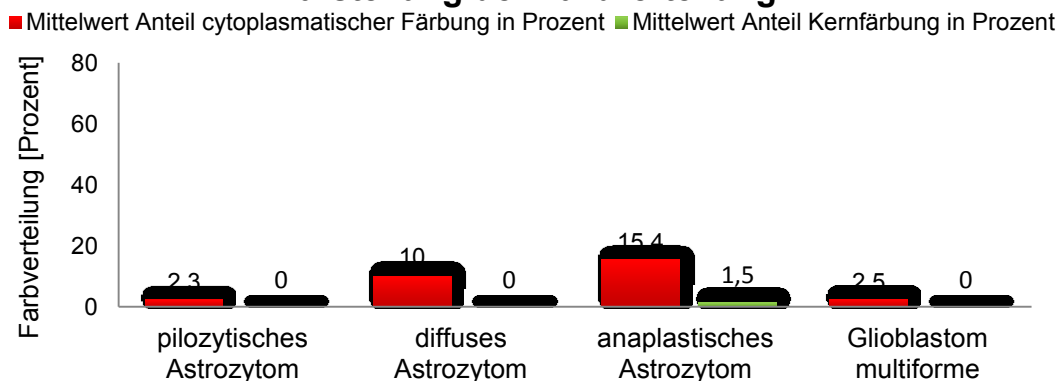
Bei der statistischen Untersuchung der Gliome nach Anti-Akt-AK Färbung ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Farbreaktion der verschiedenen Tumorgrade sichern. Der Chi<sup>2</sup>-Test lieferte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p_{\text{exakt}}=0,07$ . Die exakte Signifikanz des Kruskal-Wallis-Tests lag bei  $p_{\text{exakt}}=0,061$ .





**Abb. 28: Darstellung der Farbreaktion von Astrozytomen nach Anti-Akt-AK Färbung**  
Dargestellt ist die Fotografie von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-Akt-AK Färbung (400x vergrößert). Dabei zeigt kein Gliomgrad eine ausgeprägte Farbreaktion.

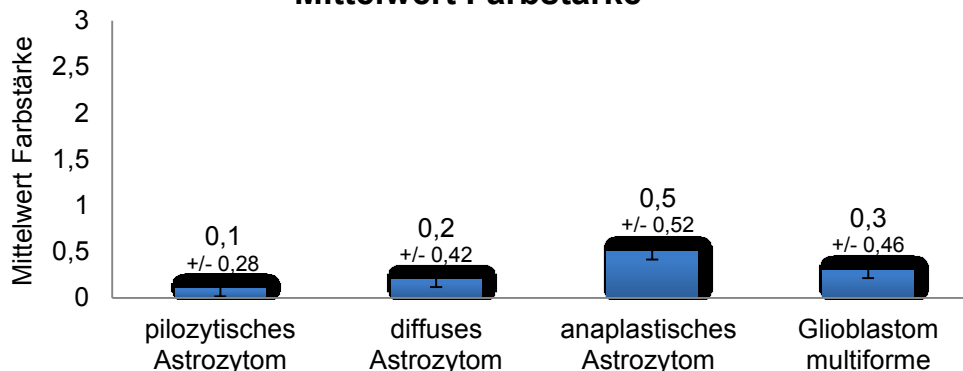
### Darstellung der Farbverteilung



**Abb. 29: Farbverteilung der vier Astrozytom-WHO-Grade nach Anti-Akt-AK Färbung**

Es fällt deutlich die nur mäßige Farbreaktion auf, die bei den anaplastischen Astrozytomen noch am stärksten ausgeprägt ist.

### Mittelwert Farbstärke



**Abb. 30: Mittlere Farbstärke von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-Akt-AK Färbung**

Nach der Färbung stellt sich durchweg ein sehr schwaches Färbeergebnis ein, das heißt auch in Gliomen zeigt sich insgesamt nur eine geringe Akt-Expression. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Tumorgad und Farbstärke in Gliomen ließ sich für Akt nicht nachweisen.

**Tabelle 11: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-Akt-AK Färbung bei Astrozytomen**

Die Tabelle fasst die Auswertungsergebnisse von Astrozytomen nach Anti-Akt-AK Färbung zusammen. Der obere Tabellenabschnitt zeigt die Farbstärke und der untere die Farbverteilung.

			Pilozytisches Astrozytom	Diffuses Astrozytom	Anaplastisches Astrozytom	Glioblastom multiforme	Gesamt
Farbstärke	negativ	Anzahl <b>Prozent</b>	12 <b>92,3</b>	8 <b>80,0</b>	6 <b>46,2</b>	6 <b>75,0</b>	32 <b>72,7</b>
	leicht	Anzahl <b>Prozent</b>	1 <b>7,7</b>	2 <b>20,0</b>	7 <b>53,8</b>	2 <b>25,0</b>	12 <b>27,3</b>
	moderat	Anzahl <b>Prozent</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>
	stark	Anzahl <b>Prozent</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>	0 <b>0,0</b>
Gesamt		Anzahl <b>Prozent</b>	13 <b>100</b>	10 <b>100</b>	13 <b>100</b>	8 <b>100</b>	44 <b>100</b>
Farbverteilung in Prozent	Zytoplasma		2,3	10,0	15,4	2,5	7,5
	Zellkern		0,0	0,0	1,5	0,0	0,4

#### 4.1.5. Auswertungsergebnisse der Färbung mit Anti-mTor-Antikörper

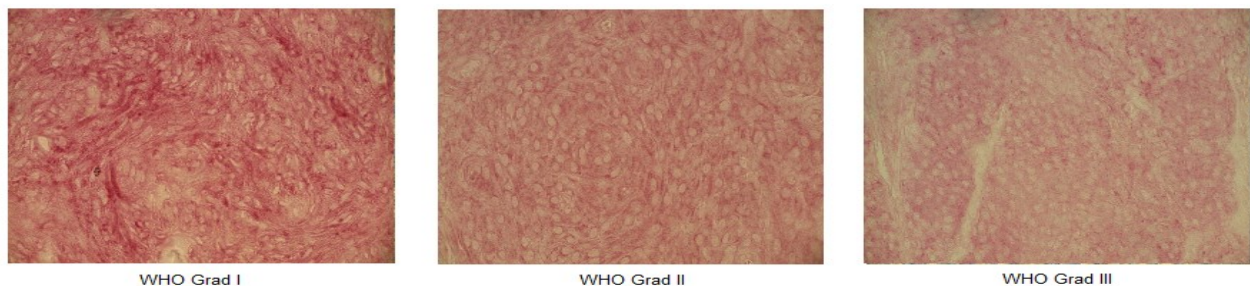
Die Analyse der Tumore nach immunhistochemischer Färbung mit Anti-mTor-Antikörper zeigte eine intensive rote Färbung der Präparate, die in Abbildung 31 am Beispiel der Meningeome verdeutlicht wird. Bei der Auswertung wurden elf benigne Meningeome (WHO Grad I), acht atypische Meningeome (WHO Grad II), acht anaplastische Meningeome (WHO Grad III), sowie 13 pilozytische Astrozytome (WHO Grad I), elf diffuse Astrozytome (WHO Grad II), 14 anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und elf Glioblastome multiforme (WHO Grad IV) begutachtet.

Die Färbung mit Anti-mTor-Antikörper war bei allen Meningeomgraden ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert und lag bei allen WHO-Graden bei etwa 58,0%. Eine Anfärbung der Zellkerne war in keinem Präparat zu finden. Einen genauen Überblick über die Farbverteilung gibt Abbildung 32.

Bei den benignen Meningeomen (WHO Grad I) zeigte sich eine starke Färbung, die im Durchschnitt eine Farbstärke von 2,6 aufwies. Dabei zeigten vier (36,4%) der Präparate eine moderate (2) Färbung und sieben (63,6%) eine starke (3). Auch die atypischen Meningeome (WHO Grad II) zeigten eine gute Farbreaktion nach Anti-mTor-AK Färbung. So war ein Präparat (12,5%) der WHO Grad II- Meningeome leicht (1), zwei Präparate (25,0%) moderat und fünf Präparate (62,5%) stark gefärbt. Die mittlere Farbstärke lag somit bei 2,5. Die anaplastischen Meningeome (WHO Grad III) zeigen mit einer mittleren Farbstärke von 1,9 eine etwas schwächere

Farbreaktion als die übrigen Tumorgade. Dabei verteilten sich die Farbstärken wie folgt: 37,5% der Präparate (n=3) zeigten jeweils eine leichte bzw. moderate Färbung und 25,0% der Präparate (n=2) waren stark gefärbt. Einen Überblick zu den Analyseergebnissen der Färbung der Meningeome mit Anti-mTor-Antikörper gibt Tabelle 12.

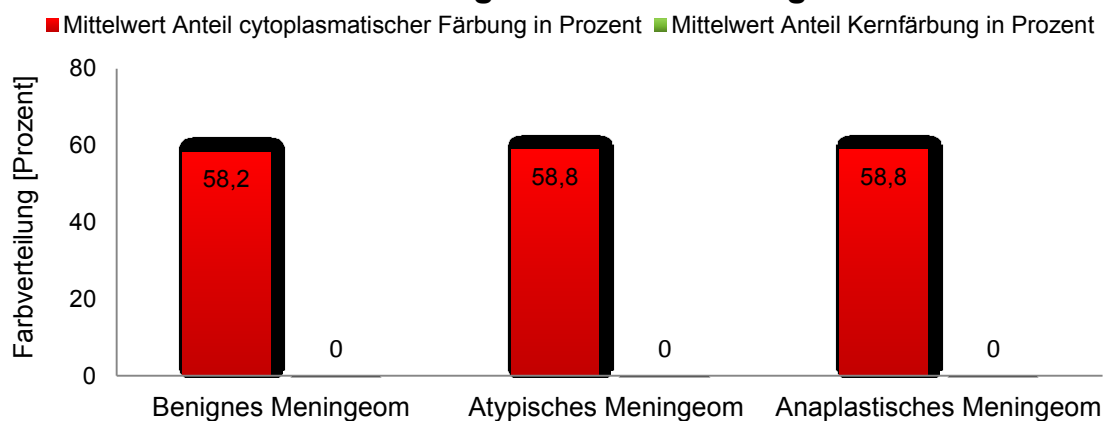
Die statistische Auswertung der Farbresultate nach Anti-mTor-AK Färbung ergab im Chi<sup>2</sup>-Test einen  $p_{\text{exakt}}$ -Wert von 0,194 und im Kruskal-Wallis-Test einen  $p_{\text{exakt}}$ -Wert von 0,1. Beide liegen oberhalb der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05, sodass sich für die Farbreaktion des Anti-mTor-Antikörpers und des Tumorgades von Meningeomen kein statistisch signifikanter Zusammenhang herleiten lässt. Abbildung 33 lässt jedoch deutliche Tendenzen erkennen: Mit steigendem WHO-Grad scheint die Expression von mTor in Meningeomen abzunehmen.



**Abb. 31: Darstellung der Farbreaktionen von Meningeomen nach Anti-mTor-AK Färbung**

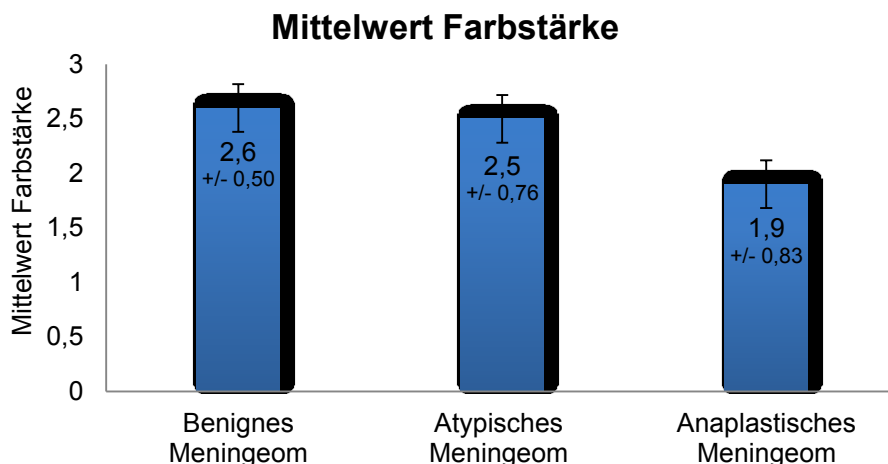
Die Abbildung zeigt die mikroskopische Fotografie verschiedener Meningeom WHO-Grade in 400facher Vergrößerung. Dabei wird die Abnahme der Farbstärke mit steigendem Tumorgad deutlich.

### Darstellung der Farbverteilung



**Abb. 32: Diagramm der Farbverteilung verschiedener Meningeom WHO-Grade nach Anti-mTor-AK Färbung**

Das über alle Tumorgade gleichmäßige Färbeausmaß wird deutlich.



**Abb. 33: Grafik der mittleren Farbstärke von Meningeomen der drei WHO-Grade nach Anti-Akt-AK Färbung**

Die Abbildung verdeutlicht die abnehmende Tendenz der mTor-Expression in Meningeomen steigender WHO-Grade nach Anti-mTor-AK Färbung. Dieser Zusammenhang ließ sich jedoch nicht statistisch signifikant sichern.

**Tabelle 12: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-mTor-AK Färbung bei Meningeomen**

Die Tabelle fasst die Auswertungsergebnisse der Meningeome nach Anti-mTor-AK Färbung zusammen. Dabei wird im oberen Tabellenabschnitt die Farbstärke und im unteren die Farbverteilung dargestellt.

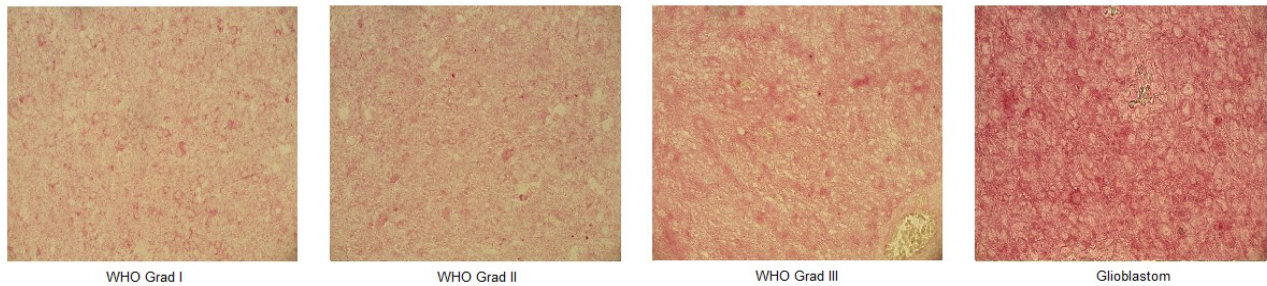
			Benignes Meningeom	Atypisches Meningeom	Anaplastisches Meningeom	Gesamt
Farbstärke	keine	Anzahl	0	0	0	0
		Prozent	0,0	0,0	0,0	0,0
	leicht	Anzahl	0	1	3	4
		Prozent	0,0	12,5	37,5	14,8
	moderat	Anzahl	4	2	3	9
		Prozent	36,4	25,0	37,5	33,3
	stark	Anzahl	7	5	2	14
		Prozent	63,6	62,5	25,0	51,9
Gesamt		Anzahl	11	8	8	27
		Prozent	100	100	100	100
Farbverteilung in Prozent	Zytoplasma		58,1	58,8	58,8	58,6
	Zellkern		0,0	0,0	0,0	0,0

Auch bei den Astrozytomen zeigt die Anti-mTor-AK Färbung deutliche Färbungsergebnisse. Insgesamt zeigte sich das Zytoplasma der Tumorpräparate mit einem Prozentsatz von durchschnittlich 59,4% überwiegend gefärbt. Im Gegensatz zu den Meningeomen ergab sich bei einem Präparat der diffusen Astrozytome (WHO Grad II) in den stark gefärbten Bereichen eine Kernfärbung, die 10,0% der Zellkerne des Präparats einnahm. Auf die Astrozytome WHO Grad II bezogen waren so im Mittel 0,91% der Zellkerne gefärbt. Die mittlere Zellkernfärbung für alle Astrozytome nach

Anti-mTor-AK Färbung lag damit bei 0,2%. Die Zytoplasmafärbung verteilte sich wie folgt auf die einzelnen Gliomgrade: Bei den pilozytischen Astrozytomen zeigten sich im Mittel 57,7% des Zytoplasmas gefärbt. Das schwächste Färbeausmaß zeigten mit einer mittleren Zellplasmafärbung von 50,0% die diffusen Astrozytome. Sowohl bei den anaplastischen Astrozytomen (63,6%) als auch bei den Glioblastomen (66,3%) zeigten im Mittel zwei Drittel des Zytoplasmas des Präparates eine Farbreaktion. Zur Veranschaulichung der Farbverteilung in Astrozytomen nach Anti-mTor-AK Färbung siehe auch Abbildung 35.

Die mittlere Farbstärke der Astrozytome nach Anti-mTor-AK Färbung zeigt eine den Meningeomen gegenläufige Tendenz, wie in Abbildung 36 deutlich wird. Die schwächste Anfärbung durch den Antikörper zeigten mit einer mittleren Farbstärke von 1,9 die pilozytischen Astrozytome (WHO Grad I). Drei WHO Grad I- Gliome (23,1%) zeigten eine starke (3) Färbung, sechs (46,1%) eine moderate (2) und weitere drei Gliome (23,1%) eine leichte (1) Färbung. Ein Präparat (7,7%) zeigte nach Anti-mTor-AK Färbung keine (0) Farbreaktion. Die diffusen Astrozytome (WHO Grad II) wiesen eine mittlere Farbstärke von 2,0 auf, die sich aus drei (27,3%) leicht gefärbten, fünf (45,4%) moderat und drei (27,3%) stark gefärbten Präparaten ergab. Die Färbung der anaplastischen Astrozytome (WHO Grad III) verteilte sich auf jeweils sechs (42,9%) moderat bzw. stark gefärbte und zwei (14,2%) leicht gefärbte Präparate. Die mittlere Farbstärke lag bei 2,3. Die stärkste Farbreaktion der Gliome zeigten nach Anti-mTor-AK Färbung die Glioblastome (WHO Grad IV). Diese hatten im Mittel eine Farbstärke von 2,4. Von den acht betrachteten Glioblastomen waren 12,5% (n=1) leicht, 37,5% (n=3) moderat und 50,0% (n=4) stark gefärbt. Die steigende Intensität der Farbreaktion in Gliomen nach Anti-mTor-AK Färbung zeigt Abbildung 34. Tabelle 13 stellt die beschriebenen Analyseergebnisse dar.

Weder in der statistischen Auswertung mittels Chi<sup>2</sup>-Test ( $p_{\text{exakt}}=0,922$ ), noch in der Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test ( $p_{\text{exakt}}=0,407$ ) zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Färbestärke nach Anti-mTor-AK Färbung und dem Gliomgrad.

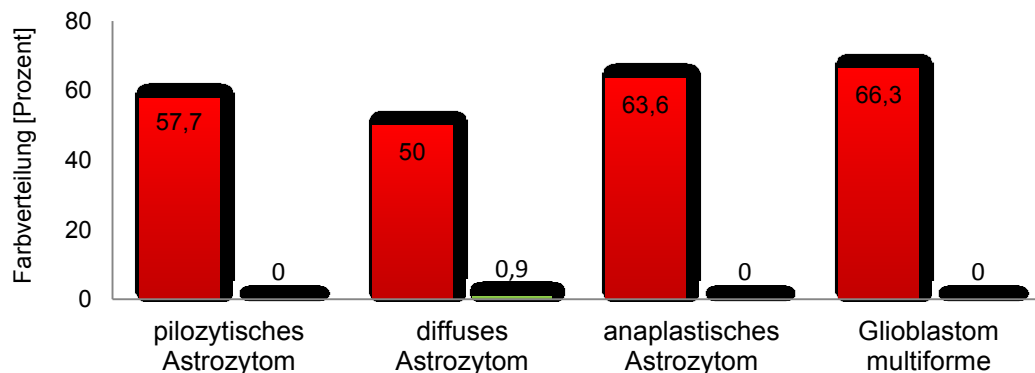


**Abb. 34: Darstellung der Farbreaktion von Astrozytomen nach Anti-mTor-AK Färbung**

Die Abbildung zeigt die Fotografien verschiedener Astrozytomgrade nach Anti-mTor-AK Färbung (400fache Vergrößerung). Mit steigendem Tumorgrad steigt dabei die Farbintensität.

### Darstellung der Farbverteilung

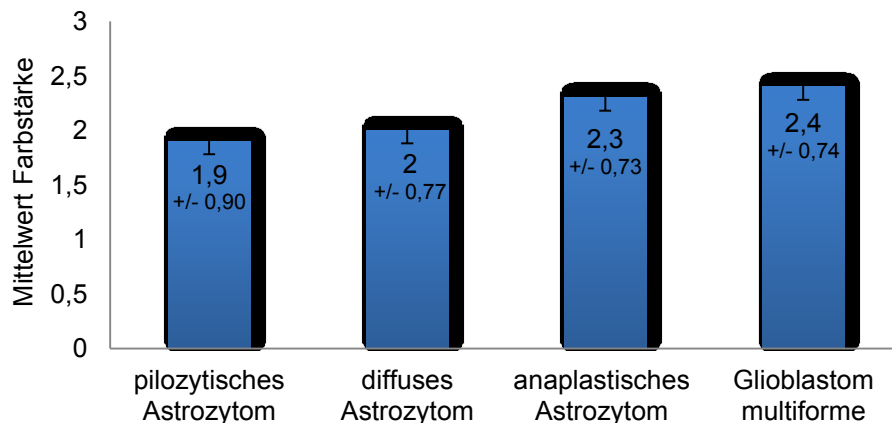
■ Mittelwert Anteil cytoplasmatischer Färbung in Prozent ■ Mittelwert Anteil Kernfärbung in Prozent



**Abb. 35: Farbverteilung von Astrozytomen der WHO-Grade nach Anti-mTor-AK Färbung**

Es wird ersichtlich, dass es insgesamt zu einer guten Anfärbung des Zytoplasmas und nur zu einer minimalen Zellkernfärbung kommt.

### Mittelwert Farbstärke



**Abb. 36: Diagramm der mittlere Farbstärke in Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-mTor-AK Färbung**

Die mit steigendem WHO-Grad statistisch nicht signifikante Zunahme der mTor-Expression wird ersichtlich.

**Tabelle 13: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-mTor-AK Färbung bei Astrozytomen**

Die Tabelle zeigt die Analyseergebnisse der Astrozytome nach Anti-mTor-AK Färbung. Der obere Tabellenabschnitt gibt die Farbstärke, der untere die Farbverteilung wider.

			Pilozytisches Astrozytom	Diffuses Astrozytom	Anaplastisches Astrozytom	Glioblastom multiforme	Gesamt
Farbstärke	negativ	Anzahl Prozent	1 7,7	0 0,0	0 0,0	0 0,0	1 2,2
	leicht	Anzahl Prozent	3 23,1	3 27,3	2 14,2	1 12,5	9 19,6
	moderat	Anzahl Prozent	6 46,1	5 45,4	6 42,9	3 37,5	20 43,5
	stark	Anzahl Prozent	3 23,1	3 27,3	6 42,9	4 50,0	16 34,7
Gesamt		Anzahl Prozent	13 100	11 100	14 100	8 100	46 100
Farbverteilung in Prozent	Zytoplasma		57,7	50,0	63,6	66,3	59,4
	Zellkern		0,0	0,9	0,0	0,0	0,2

#### 4.1.6. Die Auswertungsergebnisse der Anti-phospho-mTor-AK Färbung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Anti-phospho-mTor-Antikörper schloss 73 Tumore ein: elf benigne Meningeome (WHO Grad I), acht atypische Meningeome (WHO Grad II), acht anaplastische Meningeome (WHO Grad III), 13 pilozytische Astrozytome (WHO Grad I), elf diffuse Astrozytome (WHO Grad II), 14 anaplastische Astrozytome (WHO Grad III) und acht Glioblastome multiforme (WHO Grad IV).

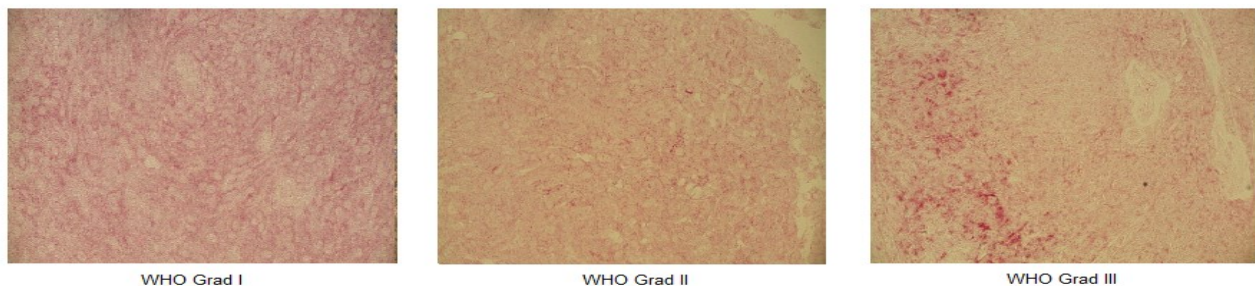
Die Anti-phospho-mTor-AK Färbung brachte im Vergleich zur Anti-mTor-AK Färbung eher schwache Färbeergebnisse, die in allen Tumorarten und –graden auf das Zytoplasma beschränkt waren. Bei den untersuchten Meningeomen nahm die Färbung im Mittel 43,9% des Zytoplasmas ein. Die einzelnen Meningeomgrade zeigten dabei folgende Farbverteilung: 43,6% des Zytoplasmas der benignen Meningeome, 46,3% des Zytoplasmas der atypischen Meningeome und 41,9% des Zytoplasmas der anaplastischen Meningeome zeigte eine Farbreaktion. Diese Verteilung wird in Abbildung 38 verdeutlicht.

Abbildung 37 zeigt, dass die Farbreaktion nach Anti-phospho-mTor-AK Färbung insgesamt weniger intensiv ausfällt. Bei den benignen Meningeomen (WHO Grad I) stellte sich mit einer mittleren Farbstärke von 1,3 eine schwache Färbung ein. Es zeigten 72,7% (n=8) der WHO Grad I- Meningeome eine leichte (1) und 27,3% (n=3) eine moderate (2) Färbung. Die mittlere Farbstärke der atypischen Meningeome



(WHO Grad II) bewegte sich mit 1,6 in einem ähnlichen Bereich. Bei diesem Meningeomgrad zeigten drei Präparate (37,5%) eine leichte und fünf Präparate (62,5%) eine moderate Färbung. Auch die anaplastischen Meningeome (WHO Grad III) zeigten mit einer durchschnittlichen Farbstärke von 1,3 eine schwache Farbreaktion. Die Färbung verteilte sich dabei wie folgt: drei Präparate (37,5%) waren moderat gefärbt, vier Präparate (50,0%) leicht und eines (12,5%) zeigte keine (0) Färbung. Die Farbstärke wird in Abbildung 39 dargestellt. Die Analyseergebnisse der Meningeome nach Anti-phospho-mTor-AK Färbung zeigt Tabelle 14.

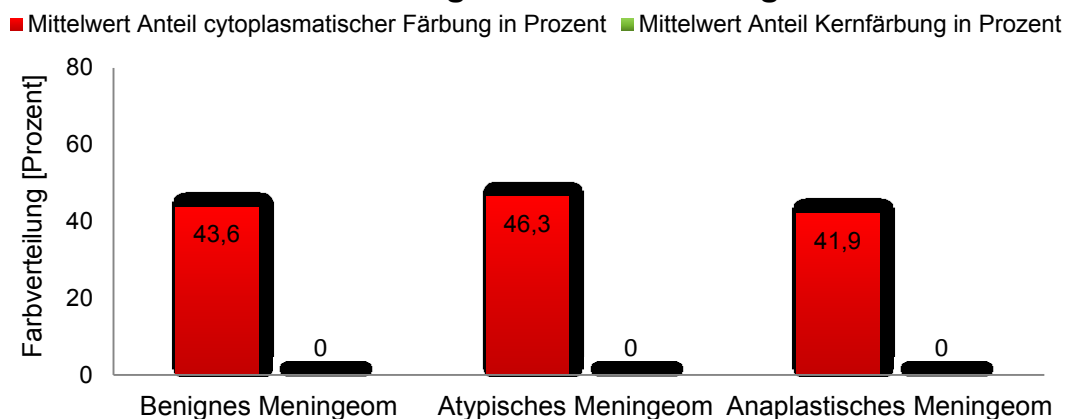
Der Zusammenhang zwischen den beschriebenen mittleren Farbstärken und den jeweiligen Tumorgraden wurde mit Hilfe des Chi<sup>2</sup>-Tests und des Kruskal-Wallis-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. Dabei ergab sich für den Chi<sup>2</sup>-Test eine Signifikanz von  $p_{\text{exakt}}=0,274$ , für den Kruskal-Wallis-Test ein  $p_{\text{exakt}}=0,349$ . Beide Werte liegen über der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit, sodass sich für die Färbung kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem jeweiligen Tumorgrad ergibt.



**Abb. 37: Farbreaktion von Meningeomen nach Anti-phospho-mTor-AK Färbung (400x)**

Die in der Abbildung dargestellte Farbreaktion nach Anti-phospho-mTor-AK-Färbung zeigt dabei in allen drei WHO-Graden eine ähnliche, schwache Farbintensität.

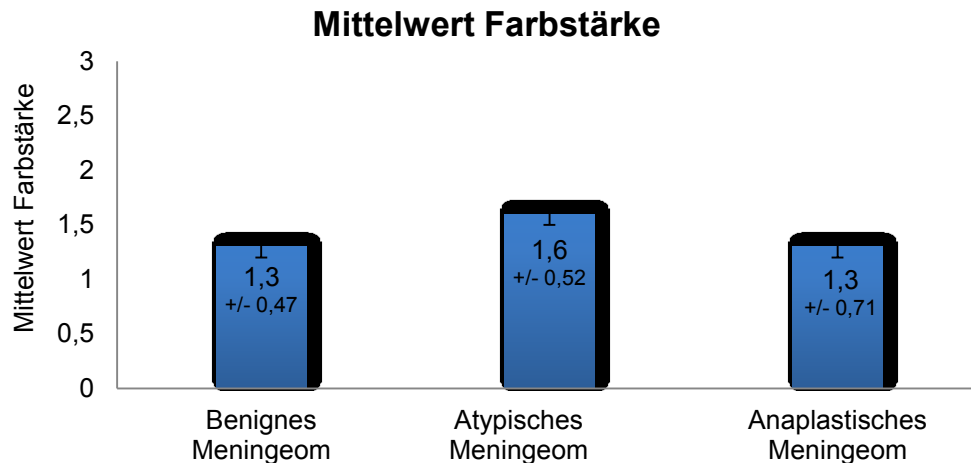
### Darstellung der Farbverteilung



**Abb. 38: Farbverteilung in Meningeomen der WHO-Grade I-III nach Färbung mit Anti-phospho-mTor-Antikörper**

Das Zytoplasma weist zu durchschnittlich 43,9% eine Farbreaktion auf, während die Zellkerne ungefärbt sind.





**Abb. 39: Mittlere Farbstärke in Meningeomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-phospho-mTor-AK Färbung**

Die Farbsintensität liegt in allen drei WHO-Graden in einem ähnlich schwachen Bereich. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Farbstärke und Tumorgrad.

**Tabelle 14: Zusammenfassung der mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-phospho-mTor-AK Färbung bei Meningeomen**

Die Tabelle fasst die Analyseergebnisse von Meningeomen nach Anti-phospho-mTor-AK Färbung zusammen. Der obere Abschnitt zeigt die Farbstärke, der untere die Farbverteilung.

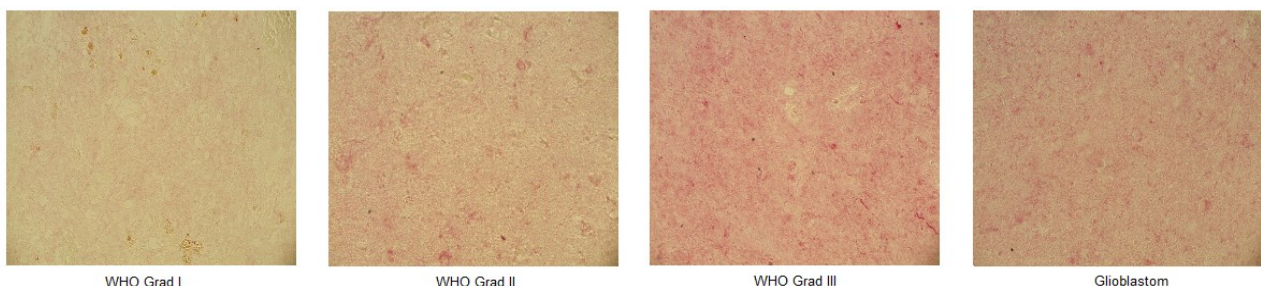
			Benignes Meningeom	Atypisches Meningeom	Anaplastisches Meningeom	Gesamt
Farbstärke	negativ	Anzahl Prozent	0 0,0	0 0,0	1 12,5	1 3,7
	leicht	Anzahl Prozent	8 72,7	3 37,5	4 50,0	15 55,6
	moderat	Anzahl Prozent	3 27,3	5 62,5	3 37,5	11 40,7
	stark	Anzahl Prozent	0 0,0	0 0,0	0 0,0	0 0,0
	Gesamt	Anzahl Prozent	11 100	8 100	8 100	27 100
Farbverteilung in Prozent	Zytoplasma		43,6	46,3	41,9	43,9
	Zellkern		0,0	0,0	0,0	0,0

Die Astrozytome zeigten unter Anti-phospho-mTor-AK Färbung nur eine schwache Farbreaktion, die eine ähnliche Verteilung wie die der Meningeome mit sich brachte. Nach Färbung mit Anti-phospho-mTor-Antikörper waren im Mittel 56,4% des Zytoplasmas eines Präparates gefärbt, aber keine Zellkerne. Betrachtet man die einzelnen Tumorgrade ergaben sich folgende zytoplasmatisch gefärbten Anteile: Die pilozytischen Astrozytome zeigten eine durchschnittliche Zellplasmafärbung von 63,0%, die diffusen Astrozytome zeigten im Mittel 56,4% des Zytoplasmas gefärbt. Mit einem zytoplasmatischen Farbanteil von durchschnittlich 42,5% ergab sich bei den anaplastischen Astrozytomen der geringste zytoplasmatisch gefärbte Anteil. Bei

den Glioblastomen zeigten im Mittel 63,8% des Zellplasmas eine Färbung. Dieser hohe Anteil der Zytoplasmafärbung wird in Abbildung 41 verdeutlicht.

Obwohl die Anti-phospho-mTor-AK Färbung ein großflächiges Farbresultat mit sich brachte, war die Färbung von geringer Intensität. Dies zeigt auch Abbildung 40. Bei den pilozytischen Astrozytomen (WHO Grad I) zeigten fünf Präparate (38,5%) keine (0), sieben (53,8%) eine leichte (1) Färbung. Nur ein Präparat (7,7%) war moderat (2) gefärbt. Somit ergab sich bei diesem Gliomgrad mit einer mittleren Färbestärke von 0,7 eine Farbreaktion, die im schwach gefärbten Bereich liegt. Die diffusen Astrozytome (WHO Grad II) zeigten eine stärkere Farbreaktion nach der Anti-phospho-mTor-Antikörper-Färbung. Diese lag im Mittel bei 1,1 und verteilte sich wie folgt auf die betrachteten Präparate: Zwei Gliome (18,2%) zeigten keine Färbung, sechs Präparate (54,5%) waren leicht und drei Präparate (27,3%) moderat gefärbt. Die anaplastischen Astrozytome (WHO Grad III) zeigten eine durchschnittliche Farbstärke von 1,3. Dabei zeigten alle betrachteten Präparate eine Färbung: Zehn der 14 Astrozytome des WHO Grades III (71,4%) waren leicht und vier (28,6%) moderat gefärbt. Die meisten Glioblastome (WHO Grad IV) zeigten eine leichte Farbreaktion nach der Färbung. Der Anteil der leicht gefärbten Glioblastome lag bei 62,5% (n=5). Die restlichen 37,5% verteilten sich auf die übrigen Färbestärken, wobei jeweils eines (12,5%) moderat, stark (3) bzw. nicht angefärbt war. Im Mittel ergab sich für die Glioblastome eine Farbstärke von 1,3. Die mittleren Farbstärken der Gliome nach Anti-phospho-mTor-Antikörper Färbung sind in Abbildung 42 grafisch dargestellt. Tabelle 15 fasst die Analyseergebnisse der Astrozytome nach dieser Färbung zusammen.

Die statistische Auswertung der Anti-phospho-mTor-AK Färbung in Astrozytomen zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen mittlerer Farbstärke und Tumorgrad. Die mittels Chi<sup>2</sup>-Test und Kruskal-Wallis-Test ermittelten exakten Signifikanzen lagen mit  $p_{\text{exakt}}=0,163$  bzw.  $p_{\text{exakt}}=0,101$  über der statistischen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05.

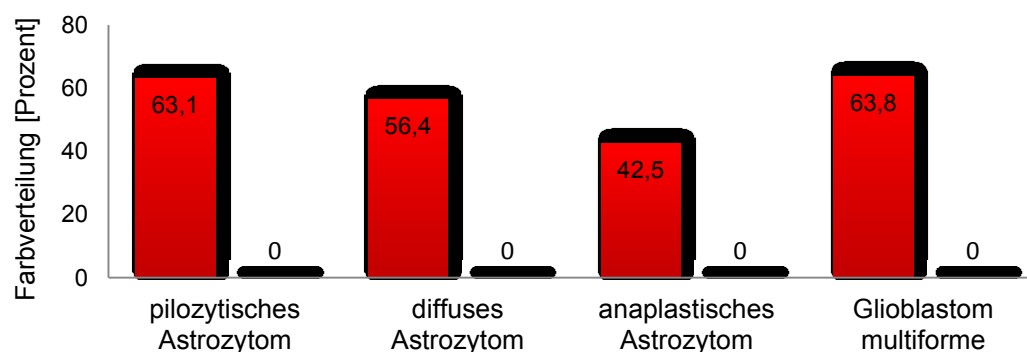


**Abb. 40: Farbreaktionen von Astrozytomen nach Anti-phospho-mTor-AK Färbung**

Die Abbildung zeigt die Fotografie von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-phospho-mTor-AK Färbung (400x vergrößert). Alle Grade zeigen eine schwache Farbreaktion.

### Darstellung der Farbverteilung

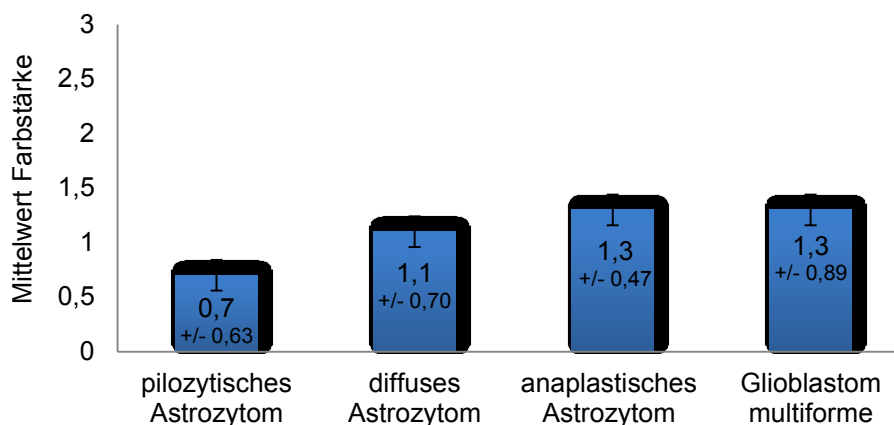
■ Mittelwert Anteil cytoplasmatischer Färbung in Prozent ■ Mittelwert Anteil Kernfärbung in Prozent



**Abb. 41: Grafik der Farbverteilung von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Färbung mit Anti-phospho-mTor-Antikörper**

Alle WHO-Graden zeigen eine deutliche Farbanreicherung im Zytoplasma und keine Zellkernfärbung.

### Mittelwert Farbstärke



**Abb. 42: Abbildung der mittleren Farbstärke von Astrozytomen verschiedener WHO-Grade nach Anti-phospho-mTor-AK Färbung**

Trotz schwacher Farbreaktion zeigt sich eine Tendenz zur Intensivierung der Farbstärke in höheren Tumorgaden, was einer Expressionszunahme mit steigendem WHO-Grad entspricht.

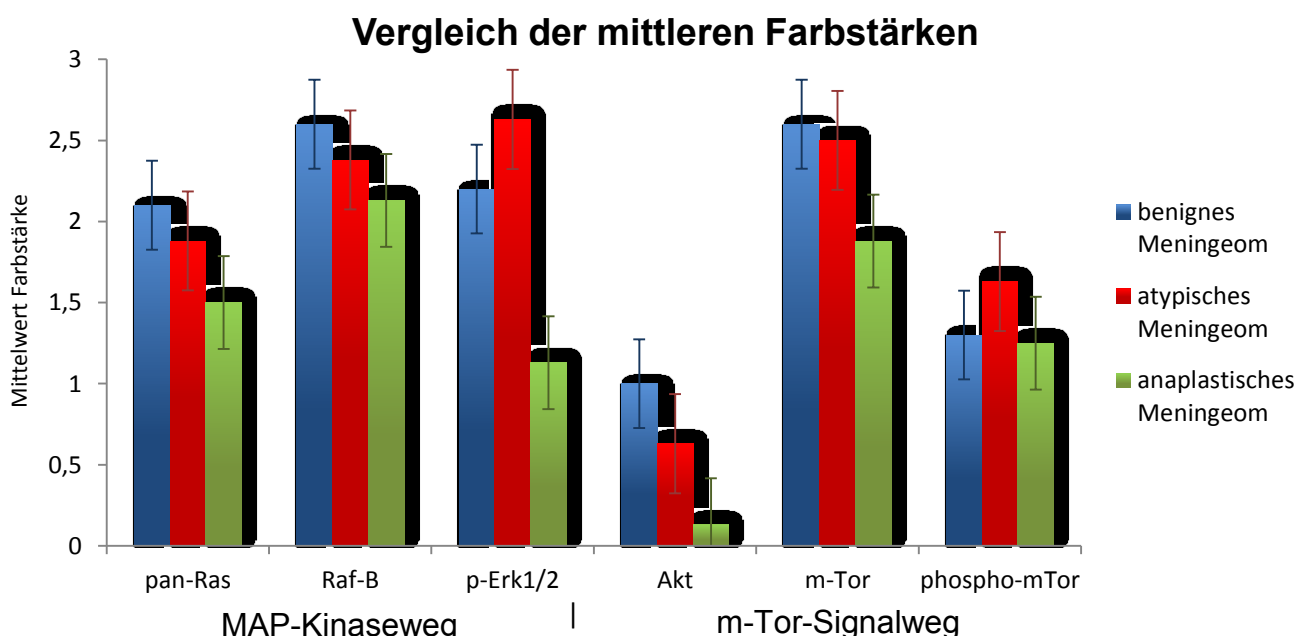
**Tabelle 15: Die mikroskopischen Analyseergebnisse der Anti-phospho-mTor-AK Färbung bei Astrozytomen**

Die Tabelle zeigt die Auswertungsergebnisse von Astrozytomen nach Anti-phospho-mTor-AK Färbung. Der obere Tabellenabschnitt stellt die Farbstärke, der untere die Farbverteilung dar.

			Pilozytisches Astrozytom	Diffuses Astrozytom	Anaplastische s Astrozytom	Glioblastom multiforme	Gesamt
Farbstärke	negativ	Anzahl Prozent	5 38,5	2 18,2	0 0,0	1 12,5	8 17,4
	leicht	Anzahl Prozent	7 53,8	6 54,5	10 71,4	5 62,5	28 60,9
	moderat	Anzahl Prozent	1 7,7	3 27,3	4 28,6	1 12,5	9 19,6
	stark	Anzahl Prozent	0 0,0	0 0,0	0 0,0	1 12,5	1 2,1
Gesamt		Anzahl Prozent	13 100	11 100	14 100	8 100	46 100
Farb- verteilung in Prozent	Zytoplasma		63,0	56,4	42,5	63,8	56,4
	Zellkern		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

#### 4.2. Zusammenfassung der Farbreaktionen der verschiedenen Antikörper

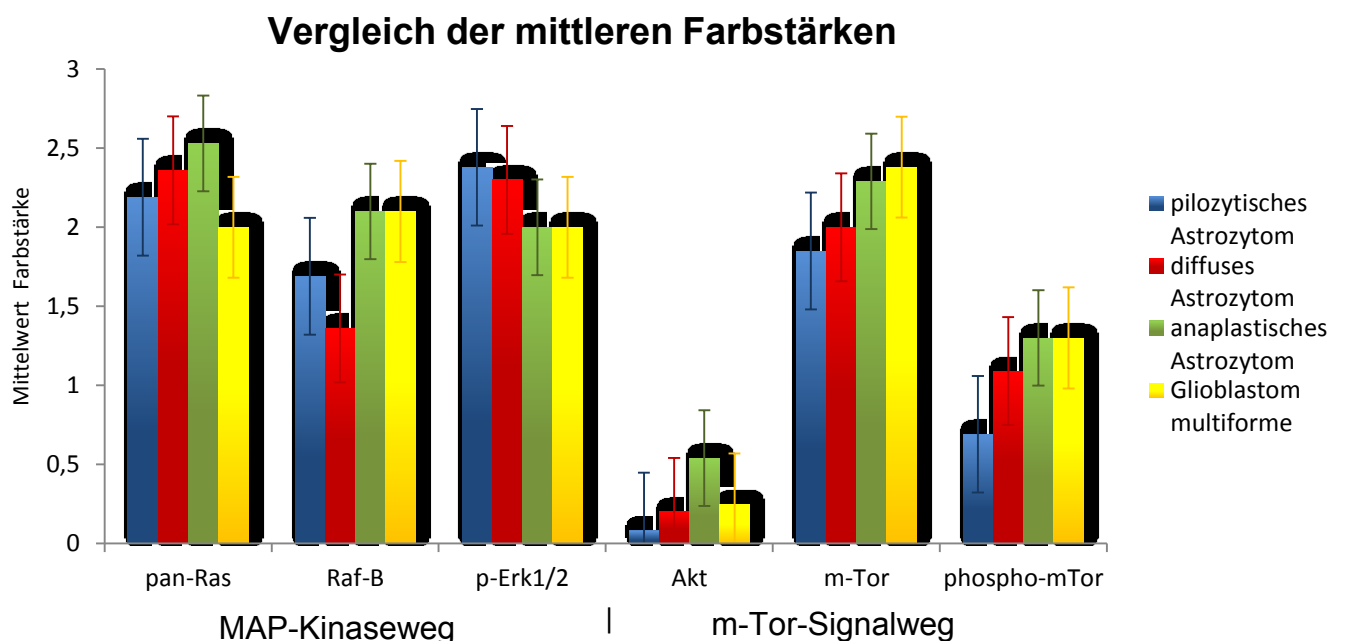
Die Meningeome zeigten in der Regel ein gutes und konstantes Färbeverhalten. Anhand Abbildung 43 zeigt sich eine deutliche Tendenz: Die Färbungen mit Anti-pan Ras-, Anti-Raf-B-, Anti-Akt- und Anti-mTor-Antikörper zeigten jeweils mit steigendem Tumorgrad eine absinkende Farbstärke. Nur die Anti-p-Erk1/2- und Anti-phospho-mTor-Antikörper Färbungen lieferten ein abweichendes Farbresultat: Für beide Signalproteine lässt sich keine Tendenz in der Entwicklung der Farbstärke in den verschiedenen WHO-Graden ableiten, es zeigt sich eine konstant starke Färbung. Diese Farbstärken spiegeln dabei die jeweilige Expression des untersuchten Signalmoleküls wider. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Meningeome nach Anti-Raf-B-AK und Anti-mTor-AK Färbung die stärkste Expression zeigten, die im Mittel einer Farbintensität von 2,3 entsprach. Die Anti-p-Erk1/2-AK Färbung zeigte insgesamt eine moderate Färbestärke von 1,9; p-Erk1/2 ist damit in Meningeomen deutlich nachweisbar. Der Anti-pan Ras-AK zeigte eine ähnlich starke Expression, die insgesamt eine mittlere Färbestärke von 1,8 erreichte. Am schwächsten zeigten sich die Färbungen mit Anti-phospho-mTor-Antikörper und Anti-Akt-Antikörper, die sich mit 1,4 bzw. 0,6 um den leichten, makroskopisch nicht sichtbaren Farbbereich bewegten.



**Abb. 43: Vergleich der mittleren Farbstärke nach verschiedenen Antikörper-Färbungen**

Die Abbildung verdeutlicht grafisch die Stärke der Farbreaktion bei Meningeomen verschiedener WHO-Grade nach Färbung mit verschiedenen Antikörpern. Neben der mittleren Farbstärke wird auch deren Standardabweichung dargestellt. Es wird deutlich, dass die Meningeome nach der Färbung mit Anti-Raf-B-Antikörper und Anti-mTor-Antikörper die stärksten Färbeergebnisse zeigen und innerhalb der einzelnen Meningeomgrade gewisse Tendenzen der Farbstärke erkennbar sind.

Die Astrozytome zeigten intensive Farbreaktionen nach der Färbung mit den untersuchten Antikörpern. Die Signalmoleküle des MAPK- und PI3K-/Akt-Signalweges sind somit auch in Gliomen exprimiert. Im Gegensatz zu den Meningeomen wiesen die Astrozytome nicht auf den ersten Blick eine klare Tendenz auf. Die Färbung stellte sich im Vergleich zu den Meningeomen insgesamt konstanter dar, was in Abbildung 44 verdeutlicht wird. Besonders pan-Ras und Raf-B zeigten mit einer mittleren Farbstärke von 2,3 bzw. 1,8 eine konstante und starke Expression. Während die mit einer mittleren Farbstärke von 2,2 insgesamt stark ausgeprägte p-Erk-Expression mit steigendem WHO-Grad abzunehmen schien, zeigten sich für mTor und phospho-mTor eine vermehrte Expression mit steigendem WHO-Grad. Auch mTor stellte sich in Astrozytomen insgesamt sehr stark exprimiert dar und zeigte im Mittel eine Farbstärke von 2,1. Die aktivierte Form, phospho-mTor, zeigte insgesamt eine schwächere Expression; die mittlere Farbindensität lag bei 1,1. Akt zeigte eine ähnliche Tendenz wie die beiden mTor-Moleküle, war dabei aber insgesamt in Astrozytomen mit einer mittleren Färbestärke von 0,3 nur sehr schwach exprimiert.



**Abb. 44: Vergleich der mittleren Farbstärke nach Färbung mit verschiedenen Antikörpern bei Astrozytomen**

Die Grafik gibt das Farbverhalten der Astrozytome verschiedener WHO-Grade nach Färbung mit diversen Antikörpern wider. Es wird gezeigt, dass sich die Farbstärke, die gemeinsam mit deren errechneter Standardabweichung dargestellt ist, bei den Astrozytomen meist im moderaten Bereich befindet. Lediglich die Anti-phospho-mTor-AK und Anti-Akt-AK Färbung stellen eine Ausnahme dar.

## 5. Diskussion

Die Bestimmung signalwegrelevanter Schlüsselmoleküle lieferte in jüngster Vergangenheit einen essentiellen Beitrag zu einer zielgerichteten Tumorthherapie. Patienten mit den unterschiedlichsten Tumoren profitieren von der Entwicklung inhibitorischer Antikörper gegen spezifische Oberflächenmoleküle, die an der Regulation von Zellwachstum und Proliferation beteiligt sind. Beispiele hierfür sind Antikörper gegen den Human Epidermal Growth Factor Receptor 2/neu (HER2/neu) zur Behandlung von metastasiertem Brustkrebs oder Rituximab, ein Antikörper gegen das B-Lymphozyten Oberflächenantigen CD20 zur Therapie von aggressiven B-Zell-Lymphomen (Leong et al. 2010).

Für primäre Hirntumore wurden der MAP-Kinase- und PI3K-/Akt- Signalweg wiederholt als die relevantesten onkogenen Signalwege beschrieben (Wong et al. 2007). Diese Erkenntnis stammt bisher meist von *in vitro*-Modellen. Bis heute gibt es nur wenige *in situ*-Studien, die das Expressionsverhalten relevanter Moleküle des MAP-Kinase- und PI3K-/Akt-Signalweges und deren Korrelation mit dem histologischen Grad der Hirntumore als Grundlage für die künftige Entwicklung gezielter immunologischer Therapiestrategien beschreiben.

In diversen Studien wurde bisher das Expressionsmuster einzelner Moleküle der Signalwege untersucht. Daraus leitete sich deren Relevanz für das Initiations- und Progressionsverhalten primärer Hirntumore ab. Johnson und Kollegen betrachteten im Jahr 2009 sowohl den MAP-Kinase- als auch den PI3K-/Akt-Signalweg in Meningeomen mittels immunhistochemischer Detektion von p-MEK-1, p-MAPK, p-Akt und p-mTor in 53 Meningeomen (Johnson et al. 2009).

Im Fokus einiger *in situ*-Studien zur Untersuchung des MAP-Kinase Signalweges in Gliomen stand die Betrachtung von Ras- und Erk-Molekülen. Bereits im Jahr 1992 untersuchten Orian et al. die Ras-Expression in Gliomen mittels Immunogold-Silber-Färbung an 62 Gliomen (Orian et al. 1992). Das Expressions- und Aktivierungsmuster von Erk in Gliomen betrachteten Mandell et al. 1998 anhand von 52 astrozytären Tumorproben (Mandell et al. 1998). Das Hauptaugenmerk der bisherigen Untersuchungen des PI3K-/Akt-Signalweges in Gliomen lag bei Akt und dessen nachgestellten Effektor mTor. Diese Moleküle wurden unter anderem von Annovazzi et al. 2009, Choe et al. 2003, Li et al. 2011 und Wang et al. 2004 auf ihre Expres-

sionsmuster, Aktivierung und Assoziation bezüglich des jeweiligen Malignitätsgrades untersucht (Annovazzi et al. 2009, Choe et al. 2003, Li et al. 2011, Wang et al. 2004).

Um einen kompletten Überblick über das Expressionsverhalten der relevanten Moleküle der MAP-Kinase- und PI3K-/Akt-Signalwege zu erhalten untersuchten wir 27 Meningeom- und 52 Gliompräparate mittels immunhistochemischer Färbungen mit entsprechenden Antikörpern gegen Ras, Raf, p-Erk, Akt, mTor und phospho-mTor hinsichtlich der Expression dieser Moleküle. Die Farbintensität der jeweiligen Antikörperfärbung, die entsprechend mit dem Expressionsgrad des jeweiligen Moleküls gleichzusetzen ist; sowie die Lokalisation und der Anteil der gefärbten Zellen wurden semiquantitativ mittels lichtmikroskopischer Betrachtung ausgewertet. Die ermittelten Ergebnisse wurden im Anschluss statistisch erfasst.

## **5.1. Bewertung der Untersuchungsmethode und des Analyseverfahrens**

### **5.1.1. Die immunhistochemische Färbung**

Routinemäßige fixierte Tumorproben bieten ein akkurates Abbild zellulärer Signalwege (Mandell et al. 1998). In der Vergangenheit zeigte sich die Untersuchung bioptisch gewonnenen Materials primärer Hirntumoren geeigneter als Zellkulturen für die Beurteilung der in vivo-Aktivität von Onkogenen (Orian et al. 1992). Aus diesem Grund erachteten wir die immunhistochemische Untersuchung des intraoperativ gewonnen Tumormaterials als geeignetste Methode zur Beurteilung der Assoziation zwischen Signalproteinexpression und deren Assoziation mit dem jeweiligen Tumorgad.

Durch verfeinerte Detektionssysteme und erhöhte Sensitivität und Spezifität der verwendeten Antikörper entwickelte sich die immunhistochemische Untersuchung in den letzten Jahren zu einem unverzichtbaren Zusatzelement der morphologischen Diagnostik in Hirntumoren. Wie auch andere Methoden weist die immunhistochemische Untersuchung natürlich nicht nur Vorteile auf. Verschiedene Fehlerquellen der Untersuchungsmethode wurden von Leong im Jahr 2004 zusammengefasst. Diese schließen nicht beeinflussbare präanalytische Faktoren, wie spezifische Materialeigenschaften hinsichtlich der Präsentation des Antigens, ein.

Beeinflussbare Fehlerquellen sind hingegen die Wahl des richtigen Detektionssystems und Chromogens für das zu untersuchende Antigen, sowie die Wahl einer geeigneten Antigen-Retrieval-Methode. Zur besseren Quantifizierung der Methode sind in Zukunft entsprechende Leitlinien zur Standardisierung essentieller Schritte der immunhistochemischen Untersuchung notwendig. Auch durch eine solche Vereinheitlichung der essentiellen Schritte der immunhistochemischen Färbung kann man jedoch gewisse Fixierungsartefakte der Technik, die zu einer Über- oder Unterschätzung der Farbreaktion führen, nicht vermeiden, sodass die Immunhistochemie immer bestenfalls eine semiquantitative Analysemethode darstellen wird (Jeuken et al. 2007, Leong 2004, Leong et al. 2010).

Für die Untersuchung der Expressionsmuster der relevanten Signalproteine der untersuchten Signalwege und deren Assoziation mit dem jeweiligen Tumorgrad eignen sich auch alternative Untersuchungsverfahren. Als Alternative oder mögliche intensivierende Untersuchung zu unseren durchgeführten immunhistochemischen Färbungen wären beispielsweise Immunfluoreszenz- oder Western Blot-Analysen möglich. Dies stellt einen Ansatzpunkt für folgende Arbeiten dar, war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

### **5.1.2. Die lichtmikroskopische Analyse der Färbeergebnisse**

Das Ausmaß der immunhistochemisch ermittelten Farbreaktion in den jeweiligen Tumorgewebeschnitten entspricht dem Expressionsgrad des zu untersuchenden Antigens. Die Beurteilung der Farbreaktion erfolgte für unsere Untersuchung durch die lichtmikroskopische Betrachtung und Abschätzung der Farbstärke, sowie der Lokalisation und des Ausmaßes der Färbung anhand einer vierstufigen Skala durch einen Betrachter. Die verwendete Farbskala reichte dabei von null (negativ) bis drei (stark positiv).

Die Wahl der Analysemethode bringt den Nachteil mit sich, dass die gesammelten Analyseergebnisse von nur einem Betrachter abhängig sind. Es erfolgte keine nähere Begutachtung der gefärbten Präparate durch einen geschulten Pathologen, was die Unterscheidung zwischen tumorspezifischem und nicht-tumorspezifischem Gewebe im Schnittpräparat erschwerte. Wie Leong et al. in ihrer Fehlerbetrachtung



bezüglich immunhistochemischer Untersuchungen bereits im Jahr 2004 beschrieben, ergeben sich aus der gewählten Analysemethode zudem Probleme hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse. Aufgrund fehlender Standards hinsichtlich der Interpretation der Farbresultate kann es zwischen verschiedenen Betrachtern zu großen Abweichungen bezüglich der Beurteilung einer positiven oder negativen Färbung bzw. der Einschätzung der Farbstärke kommen. Auch die individuelle Analyse durch den Betrachter unterliegt einer täglichen Variabilität. Die zukünftige Einführung definitiver Standards zur Bewertung einer immunhistochemischen Färbung könnte helfen eine bessere Reproduzierbarkeit lichtmikroskopisch gewonnener Analyseergebnisse zu gewährleisten (Leong 2004).

## **5.2. Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung in Meningeomen**

### **5.2.1. Initiationsrelevanz des MAP-Kinase-Signalweges in Meningeomen**

Der Wachstumsfaktor PDGF wurde bereits in den 90er Jahren von zahlreichen Autoren als einer der relevantesten Stimulatoren der Meningeomzellproliferation beschrieben (Todo et al. 1996, Wang et al. 1990). Die intrazellulären Signalwege, die die mitogenen Signale auf den Zellkern übertragen, waren bis zu diesem Zeitpunkt weitgehend unbekannt und gaben Anlass für zahlreiche anschließende Studien. Im Jahr 2001 untersuchten Johnson et al. die Signaltransduktion über den MAP-Kinase-Signalweg in Meningeomen mittels Western Blot- Analysen. Sie beschrieben die konstitutive Expression von MAPK und p-MAPK in leptomeningealen Zellen und Meningeomen aller Grade (Johnson et al. 2001). Mawrin et al. vertieften diese Erkenntnis im Jahr 2005 durch Expressionsanalysen von Proteinen des MAP-Kinase-Signalweges in Meningeomen aller drei WHO-Grade mittels immunhistochemischer Färbungen und Western Blotting. Sie zeigten eine Signalwegsaktivierung unterschiedlichen Ausmaßes in benignen und malignen Meningeomen: Nahezu alle WHO I-Meningeome zeigten eine deutliche Expression von Ras und Raf. Die MAP-Kinasen, zu denen auch Erk zählt, zeigten in niedriggradigen Meningeomen eine starke, sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch gelegene, Farbreaktion nach immunhistochemischer Färbung. Im Vergleich dazu ergaben sich für atypische und anaplastische Meningeome deutlich verminderte Expressionslevel der drei untersuchten Proteine des Signalweges, sodass Mawrin und Kollegen der Kaskade einen

bedeutenden Anteil am Wachstum der Meningeome, aber nicht an deren Progression in höhere WHO-Grade, zugeschrieben (Mawrin et al. 2005). Johnson und Kollegen widmeten sich im Jahr 2009 in einer Studie erneut der Expression relevanter Proteine des MAP-Kinase-Signalweges in Meningeomen. Sie untersuchten mittels immunhistochemischen Färbungen die Expression von p-MEK-1 und p-MAPK in 53 Meningeomen unterschiedlicher WHO-Grade unter explizierter Betrachtung der höhergradigen Meningeome. Es zeigte sich eine starke Expression von p-MEK-1 und p-MAPK in allen Meningeomgraden, sodass die Autoren einen selektiven Zusammenhang der Signalwegaktivierung mit der Entdifferenzierung der Meningeome ausschlossen (Johnson et al. 2009).

In Anlehnung an die beschriebenen Studien untersuchten wir in unserer Studie 27 Meningeome aller drei WHO-Grade mittels immunhistochemischer Färbungen bezüglich der Expression relevanter Moleküle des MAP-Kinase Signalweges. Dabei wurde für die Signalkaskade die Expression von pan Ras, Raf-B und p-Erk1/2 betrachtet.

Für das übergeordnete Molekül des MAP-Kinase-Signalweges, Ras, zeigte sich insgesamt eine starke zytoplasmatische Farbreaktion nach immunhistochemischer Färbung in allen drei WHO-Graden, die im Mittel etwa die Hälfte des betrachteten Tumorschnittes einnahm. Insgesamt ist somit in allen Meningeomgraden von einer Expression des Ras-Proteins auszugehen. Die Intensität der Färbung nahm mit steigendem WHO-Grad ab (siehe dazu Abb. 9). Statistisch ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Ras-Expression und Tumorgad weder mittels  $\chi^2$ -, noch mittels Kruskal-Wallis Test belegen. Für die statistische Sicherung der gezeigten Tendenzen ist eine Erweiterung der Untersuchung auf größere Tumormengen notwendig. Ohne statistische Signifikanz lässt sich somit festhalten, dass die Expression des Ras-Proteins in Meningeomen tendenziell mit steigendem WHO-Grad abnimmt. Eine ähnliche Tendenz lässt sich hinsichtlich der Expression der Raf-Kinase zeigen. Insgesamt zeigte die Raf-Antikörperfärbung in Meningeomen eine starke zytoplasmatisch gelegene Färbung in allen drei WHO-Graden. Die Farbtintensität stellte sich im Vergleich zur Anti-pan-Ras-Antikörperfärbung deutlich intensiver dar, es zeigten sich jedoch ähnliche Tendenzen: Die Intensität der Färbung, und damit die Raf-Expression, nahm mit steigendem Meningeomgrad ab. Diese deutliche Tendenz ließ

sich aufgrund des nur in begrenztem Ausmaß zur Verfügung stehenden Tumormaterials nicht statistisch signifikant sichern.

Die p-Erk-Expression zeigte in den untersuchten Meningeomen ein deutlich von Ras und Raf unterschiedliches Muster. Nach immunhistochemischer Färbung mit dem Anti-p-Erk1/2- Antikörper kam es zu einer intensiven Farbreaktion, die sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär gelegen war. Dies ist mit der Translokation von phosphoryliertem, aktiviertem Erk in den Zellkern zu erklären. Da bei der Migration von Erk den zellmembranständigen Proteinen N-Cadherin und Integrin- $\alpha 6$  eine bedeutende Rolle zukommt (Velpula et al. 2012), ist auch das randständige, streifige Farbmuster nach Anti-p-Erk1/2- Antikörperfärbung erklärbar. Insgesamt stellte sich die Färbung intensiv dar, es zeigte sich jedoch auf den ersten Blick keine eindeutige Tendenz wie nach Ras- und Raf-Antikörperfärbung. Die stärkste Expression von p-Erk1/2 zeigten atypische Meningeome, die schwächste, überraschenderweise, anaplastische WHO Grad III-Meningeome (Vgl. Abb. 21). Die statistische Analyse zeigte trotz der limitierten Materialmenge sowohl mittels  $\chi^2$ , als auch mittels Kruskal-Wallis-Test einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der p-Erk1/2-Expression und dem Tumorgrad. Weiterführende statistische Analysen mittels Mann-Whitney-Test bestätigten einen signifikanten Unterschied bezüglich der p-Erk1/2-Expression zwischen atypischen und anaplastischen Meningeomen ( $p_{\text{exakt}} = 0,028$ ). Ein signifikanter Unterschied bezüglich der p-Erk1/2-Expression zwischen benignen Meningeomen und aggressiveren WHO Grad II oder III- Meningeomen konnte mittels Mann-Whitney-Test nicht gesichert werden. Es lässt sich also festhalten, dass die Expressionsraten von p-Erk in anaplastischen Meningeomen signifikant höher sind als in atypischen, was wiederum den Tendenzen der Expressionsraten von Ras und Raf entspricht.

In Zusammenschau der bisherigen Untersuchungen bezüglich der Relevanz des MAP-Kinase-Signalweges in Meningeomen lässt sich festhalten, dass die relevanten Moleküle Ras, Raf und p-Erk1/2 eine starke Expression in allen WHO-Graden zeigen. Die Aktivierung des Signalweges ist somit in jedem Fall relevant für Meningeome. Unsere aktuelle immunhistochemische Untersuchung zeigte dabei deutliche Tendenzen hinsichtlich einer verstärkten Expression der signalwegrelevanten Moleküle in niedrigen Meningeomgraden. Ähnliche Tendenzen ließen sich aus der Analyse der Ras-, p-Raf und p-MAPK-Expression von Mawrin et al. 2005 ableiten

(Mawrin et al. 2005). Die starke Expression der signalwegrelevanten Moleküle in niedrigen Meningeomgraden lässt vermuten, dass dem MAP-Kinase-Signalweg eine bedeutende Rolle in der Initiation von Meningeomen zufällt. Diese Erkenntnis gilt es in zukünftigen Studien zu vertiefen.

### **5.2.2. Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges in Meningeomen mit möglichen Tendenzen**

Anschließend an ihre Untersuchungen des MAP-Kinase-Signalweges führten Johnson und Kollegen im Jahr 2002 eine Studie zur Beurteilung der Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges in Meningeomen durch. Die neun mittels Western Blot-Analysen untersuchten Meningeome zeigten dabei eine Expression von pAkt verschiedenster Intensität. Eine nachfolgende Stimulation der Zellkulturen mit PDGF-BB hatte keinen Einfluss auf die Akt-Gesamtlevel, es zeigte sich jedoch eine deutlich verstärkte Akt-Aktivierung. Daraus schlossen Johnson und Kollegen auf die Übertragung mitogener Signale von PDGF-BB in Meningeomen durch den PI3K-/Akt-Signalweg (Johnson et al. 2002). Die Untersuchungen legten einen Grundstein für die Analyse der PI3K-/Akt-Kaskade in Meningeomen, ließen aber das Ausmaß der Signalwegaktivierung in den einzelnen Meningeomgraden und damit deren Bedeutung für Initiation und Progression dieser Tumoren offen. Der gezielten Betrachtung des Signalweges in WHO I- bis WHO III- Meningeomen widmeten sich Mawrin et al. in ihrer 2005 erschienen Studie: Sie untersuchten 70 Meningeome hinsichtlich der Expression von pAkt durch immunhistochemische Färbungen mit einem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex und Western Blotting. In den immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich eine deutliche nukleäre und zytoplasmatische Reaktion von pAkt, die mit steigendem WHO-Grad zunahm. Sie schlussfolgerten daraus, dass der PI3K-/Akt-Signalweg in Meningeomen deren aggressives Verhalten bedingt (Mawrin et al. 2005). Dieses Ergebnis griffen Johnson et al. 2009 auf und untersuchten den PI3K-/Akt-Signalweg in 53 Meningeomen unter anderem mittels immunhistochemischer Studien hinsichtlich der Expression von pAkt und seinem untergeordneten Effektor mTor. Es zeigte sich als Bestätigung der Resultate von Mawrin et al. eine starke Expression von pAkt und p-mTor in Meningeomen jeden WHO-Grades. Diese nahm mit steigendem Malignitätsgrad zu. Da es jedoch in allen Malignitätsgraden zu einer starken Expression kam, sahen Johnson und Kollegen

keinen Zusammenhang mit einer Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges und einer Entdifferenzierung von Meningeomen (Johnson et al. 2009).

Unsere Studie untersuchte in Anlehnung an die vorher beschriebenen Studien die Expression relevanter Moleküle des PI3K-/Akt-Signalweges in 27 Meningeomen. Im Fokus standen dabei die Proteine Akt, mTor und dessen aktive Form phospho-mTor. Die Expression von Akt stellte sich in Meningeomen insgesamt schwach dar. Maximal 20 Prozent des Zytoplasmas zeigten eine Farbreaktion nach Anti-Akt-AK Färbung, die gemessen anhand ihrer Farbstärke nur schwach war. Trotz der somit nur mäßigen Expression von Akt in Meningeomen zeigten sich Tendenzen bezüglich des Auftretens in den einzelnen Malignitätsgraden: Die niedriggradigen Meningeome zeigten die stärkste Akt-Expression, was sich sowohl in der Anzahl der gefärbten Zellen, als auch in der Intensität der Färbung mit Anti-Akt-Antikörper widerspiegelte. In den anaplastischen WHO Grad III- Meningeomen zeigte sich hingegen nahezu keine Expression von Akt. Somit ist für die Expression von Akt in Meningeomen eine Tendenz hinsichtlich eines verstärkten Auftretens in niedrigen Meningeomgraden zu finden. Weder mittels  $\chi^2$ -Test noch mittels Kruskal-Wallis Test ließ sich jedoch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen Farbstärke und dem Malignitätsgrad von Meningeomen sichern.

Der nachgestellte Effektor von Akt, die Protein-Kinase mTor, zeigt eine ähnliche Tendenz: Die Expression nimmt deutlich mit steigendem Malignitätsgrad ab. Insgesamt zeigen die untersuchten Meningeome jedoch eine starke zytoplasmatische Expression von mTor. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen mTor-Expression und Tumorgrad konnte wiederum nicht gesichert werden.

Im Gegensatz zur starken Expression von mTor zeigte seine aktive Form phospho-mTor ein nur mäßig starkes Auftreten in Meningeomen. Die Farbstärke, sowie der Anteil gefärbter Zellen nach Anti-phospho-mTor-Färbung waren deutlich schwächer als für die nicht-aktivierte Protein-Kinase. Die Expression zeigte sich in allen Malignitätsgraden ähnlich schwach ausgeprägt, es zeigten sich keine Tendenzen wie für Akt oder mTor. Auch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen phospho-mTor-Expression und WHO-Grad ließ sich nicht sichern. Insgesamt scheint die aktivierte Form von mTor für Meningeome damit im Vergleich zur Gesamt-mTor-Expression in Meningeomen nur von geringer Relevanz zu sein.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen lieferten so ein von den vorherigen Studien differenziertes Bild hinsichtlich der Aktivierung der PI3K-/Akt-Signalkaskade in Meningeomen. Während sowohl Mawrin et al. 2005 als auch Johnson et al. 2008 eine vermehrte Aktivierung des Signalweges in aggressiven Meningeomformen beschrieben, zeigte sich aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen eine verstärkte Expression von Akt und mTor in niedrigen Malignitätsgraden, die dem PI3K-/Akt-Signalweg so eine Bedeutung für die Initiation von Meningeomen zuschreibt. Die genaue Ursache für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist nicht klar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in den vorangegangenen Studien die aktivierten, phosphorylierten Formen der untersuchten Proteine und nicht deren Gesamtlevel im Fokus standen. Man könnte somit mutmaßen, dass die Aktivierung des Signalweges mit einer Verminderung der Gesamt-Proteinlevel und, wie von Mawrin et al. beschrieben, mit einem Tumorprogress einhergeht.

Die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges in benignen Meningeomen, die sowohl in unserer als auch in vorherigen Studien beschrieben wurde, schreibt der Signalkaskade eine Bedeutung bei der Initiation von Meningeomen zu. Diese scheint parallel zur Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade aufzutreten (Johnson et al. 2002). Alles in allem zeigt der PI3K-/Akt-Signalweg eine Aktivierung in Meningeomen aller WHO-Grade und scheint somit in diesen Tumoren eine essentielle Rolle zu spielen, die es in Zukunft noch weiter zu erkunden gilt.

### **5.3. Ergebnisse der mikroskopischen Auswertung in Gliomen**

#### **5.3.1. Relevanz des MAP-Kinase-Signalweges in pilozytischen Astrozytomen und Hinweise bezüglich seiner Progressionsrelevanz in infiltrierenden Gliomen**

Schon frühzeitig wurde dem MAP-Kinase-Signalweg eine essentielle Rolle in Gliomen zugeschrieben. Anfang der 90er Jahre beschrieben diverse Studien die vermehrte Expression von onkogenem Ras in Gliomen: Die im Jahr 1991 von Arvanitis et al. beschriebene vermehrte Expression des p21Ras Onkogens in höhergradigen Gliomen wurde von Orian et al. 1992 mittels Immunogold-Silberfärbung an 62 Gliomen bestätigt (Arvanitis et al. 1991, Orian et al. 1992). Den initialen immunhistochemischen Studien folgten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Expression relevanter Moleküle des MAP-Kinase-Signalweges in Gliomen. Mandell et al. legten

in ihren Untersuchungen 1998 den Schwerpunkt auf die Expressionsanalyse zweifach phosphorylierter Erks (dp-Erk) in Astrozytomen verschiedener WHO-Grade. Es zeigte sich eine fokale, zytoplasmatische Expression von dp-Erk in pilozytischen Astrozytomen, während sich für infiltrierende Astrozytome eine weit gestreute, teilweise nukleär gelegene Expression von dp-Erk manifestierte. Die Autoren sahen trotz des höchsten Anteils der Erk-Expression in Glioblastomen keinen Zusammenhang der dp-Erk-Expression mit einer malignen Progression, da auch niedriggradige Gliome bereits eine deutliche Erk-Aktivität aufwiesen. Sie schrieben dem MAP-Kinase-Signalweg eine Bedeutung für den Erhalt des glialen Phänotyps zu (Mandell et al. 1998). Im Gegensatz dazu sahen Mizoguchi et al. im Jahr 2006 in ihrer immunhistochemischen Studie zur Untersuchung der MAPK-Expression in 82 astrozytären Gliomen anhand einer signifikant verstärkten Expression in Glioblastomen im Vergleich zu anaplastischen Astrozytomen eine deutliche Assoziation der Expression der MAPK mit einem Progress zu malignen Phänotypen (Mizoguchi et al. 2006). Bis heute gibt es zur Bedeutung der MAP-Kinase-Kaskade in infiltrierenden Gliomen noch keine einheitliche Studienlage. Anders sieht es dagegen für die pilozytischen Astrozytome aus, die sich aufgrund ihrer fehlenden Invasivität als eine „von den WHO Graden II - IV unabhängige Tumorentität“ (Louis et al. 2007) darstellen. Im Jahr 2011 beschrieben sowohl Jentoft et al. als auch Rodriguez et al. mittels immunhistochemischer Studien die Expression von p-Erk in pilozytischen Astrozytomen. Jentoft et al. legten hierbei den Schwerpunkt ihrer Untersuchungen auf Neurofibromatose Typ 1- assoziierte pilozytische Astrozytome und wiesen für diese eine uniforme Expression von p-Erk nach, während Rodriguez et al. eine uniforme Ausprägung der p-Erk-Expression in pilozytischen Astrozytomen verschiedener Aggressivitätsgrade nachwiesen (Jentoft et al. 2011, Rodriguez et al. 2011).

Zur genaueren Analyse der relevanten Moleküle des MAP-Kinase-Signalweges untersuchten wir 52 Gliome, darunter 16 pilozytische Astrozytome, immunhistochemisch bezüglich der Expression von pan Ras, Raf-B und p-Erk1/2.

Pan Ras zeigte dabei eine starke zytoplasmatisch gelegene Expression, die in allen WHO-Graden nahezu drei Viertel des Zytoplasmas einnahm. Die Farbstärke, und damit auch die Expression, zeigte sich in allen Malignitätsgraden einheitlich ohne eindeutig erkennbare Tendenzen einer verstärkten Expression. In der statistischen Evaluation der Ergebnisse zeigte sich im Chi<sup>2</sup>-Test eine Signifikanz des Zusammen-

hangs zwischen Ras-Expression und Tumorgrad ( $p_{\text{exakt}}=0,045$ ). Diese ließ sich aufgrund des nur in limitiertem Umfang zur Verfügung stehenden Tumormaterials nicht im Kruskal-Wallis-Test reproduzieren. Die starke Expression von pan Ras in allen Malignitätsgraden weist auf eine bedeutende Rolle der Protein-Kinase in Gliomen hin. Betrachtet man die infiltrierenden Gliome unabhängig von den pilozytischen Astrozytomen kann man eine leichte Tendenz einer verstärkten Expression mit steigendem WHO-Grad erkennen, was die Ergebnisse der Studie von Mizoguchi et al. 2006 bestätigen würde. Mit den Glioblastomen wird diese Tendenz jedoch aufgehoben: Es zeigt sich eine deutlich verringerte Expression von pan Ras in Glioblastomen im Vergleich zu den anaplastischen Astrozytomen. Dies könnte in der mangelnden Differenzierung zwischen primären und sekundären Glioblastomen in unserer Studie begründet sein und liefert die Grundlage für eine künftige differenzierte Betrachtung der Ras-Expression in primären und sekundären Glioblastomen. Auch die Raf-B-Protein-Kinase zeigte in den untersuchten Glioblastomen eine starke zytoplasmatische Expression, die sich insgesamt etwas schwächer darstellte als die pan Ras-Expression. Für Raf-B ergaben sich initial keine Expressionstendenzen. Sowohl der  $\chi^2$  als auch der Kruskal-Wallis-Test ergaben jedoch in der statistischen Auswertung signifikante Unterschiede bezüglich der Raf-B-Expression in den verschiedenen Tumorgraden ( $p_{\text{exakt}}=0,027$  bzw.  $p_{\text{exakt}}=0,023$ ). Der daraufhin angeschlossene Mann-Whitney-Test zeigte signifikante Unterschiede in der Raf-B-Expressionsrate zwischen diffusen und anaplastischen Astrozytomen einerseits ( $p_{\text{exakt}}=0,014$ ) und diffusen Astrozytomen und Glioblastomen andererseits ( $p_{\text{exakt}}=0,012$ ). Man kann damit festhalten, dass die Expression von Raf-B in diffusen Astrozytomen signifikant niedriger ist als in aggressiven WHO Grad III- und IV-Gliomen und dem MAP-Kinase-Signalweg damit eine Rolle bei der Progression von Gliomen zuschreiben. Zu beachten gilt jedoch auch hier die fehlende Differenzierung primärer und sekundärer Glioblastome, die jedoch auf das Gesamtergebnis keinen Einfluss zu nehmen scheint. Die statistische Untersuchung der Expressionsunterschiede zwischen pilozytischen und diffusen Astrozytomen zeigte keinen signifikanten Unterschied, was aufgrund der unterschiedlichen Tumorentitäten auch nicht zu erwarten war.

Nachdem die Untersuchungen von pan Ras und Raf-B bereits Hinweise auf eine Progressionsrelevanz des MAP-Kinase-Signalweges in Gliomen geliefert hatten, folgte die Untersuchung der p-Erk1/2-Expression in Gliomen. Die immunhisto-



chemische Färbung mit dem entsprechenden Antikörper zeigte die streifige, randständige zytoplasmatische Färbung mit teilweise intensiver nukleärer Färbung, die uns bereits von den Meningeomen her bekannt war und mit der Translokation von Erk in den Zellkern in Verbindung zu bringen ist. Insgesamt zeigte sich die Farbreaktion, und damit auch die Expression, hinsichtlich Färbeausmaß und –intensität stark ausgeprägt. Es zeigte sich eine einheitliche Expression von p-Erk1/2 in allen WHO-Graden ohne deutliche Tendenzen hinsichtlich der Expressionsstärke. Auch statistisch ließ sich mittels Chi<sup>2</sup>-Test oder Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied zwischen der p-Erk1/2-Expression in den verschiedenen Tumorgaden nachweisen. Es lässt sich jedoch festhalten, dass die pilozytischen Astrozytome insgesamt eine starke Expression von p-Erk1/2 aufwiesen und die Protein-Kinasen auch in infiltrierenden Gliomen ein einheitliches starkes Auftreten zeigten.

Insgesamt lässt sich aus unseren immunhistochemischen Studien schließen, dass der MAP-Kinase-Signalweg in pilozytischen Astrozytomen eine bedeutende Rolle spielt, da die drei untersuchten relevanten Moleküle eine starke Expression zeigten. Die Aktivierung des Signalweges kann verschiedene Ursachen haben, die bereits durch diverse vorangegangene Studien beschrieben wurden. Kinder mit Neurofibromatose Typ 1 zeigen eine deutliche Prädisposition für die Entwicklung pilozytischer Astrozytome. Die damit einhergehende Inaktivierung des Ras-Inhibitors Neurofibromin geht mit einer Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade einher (Lau et al. 2000). Die damit verbundene vermehrte Aktivierung signalwegrelevanter Moleküle wurde von Jentoft et al. im Jahr 2011 für dp-Erk nachgewiesen (Jentoft et al. 2011). Auch in sporadischen pilozytischen Astrozytomen kommt es zu einer gesteigerten Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges. Sharma et al. schrieben dies im Jahr 2005 einer onkogenen Ras-Mutation zu, die jedoch von ihnen nur in einem pilozytischen Astrozytom nachgewiesen werden konnte (Sharma et al. 2005). Den Hauptmechanismus der MAP-Kinase-Signalwegaktivierung in pilozytischen Astrozytomen beschrieben Jones et al. 2008 und 2009. Sie charakterisierten initial die hauptursächliche Tandem-Duplikation mit resultierendem konstitutiv aktivem BRAF-KIAA1549 Fusionsgen und im Folgenden die Aktivierung der Signalkaskade in pilozytischen Astrozytomen durch weitere Raf-Veränderungen wie der Bildung des Fusionsgens SRGAP3-RAF1 oder einer aktivierenden Insertion von drei Basenpaaren in Codon 598 des B-Raf-Gens (Jones et al. 2008, Jones et al. 2009). Die Ergebnisse

unserer Studie belegen die bereits vorbeschriebene Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges in pilozytischen Astrozytomen.

Auch die infiltrierenden Gliome zeigten in unserer Studie eine deutliche Expression der relevanten Moleküle des MAP-Kinase-Signalweges. Vorangegangene Studien zeigten ebenfalls ein verstärktes Auftreten einzelner Proteine, beispielsweise von dp-Erk, waren sich jedoch hinsichtlich der Progressionsrelevanz des Signalweges uneinig (Mandell et al. 1998, Mizoguchi et al. 2006). Eine abschließende Klärung bezüglich der Progressionsrelevanz der MAP-Kinase-Kaskade in infiltrierenden Gliomen gibt auch unsere Studie nicht, es zeigen sich insgesamt jedoch einzelne, teilweise statistisch signifikante Tendenzen, die auf eine Beteiligung des Signalweges an der Progression hin zum malignen Phänotyp hinweisen. Zur Sicherung der Ergebnisse ist die Wiederholung der Studie an einer größeren Tumormenge notwendig. Die Aktivierung des Signalweges kann dabei verschiedene Ursachen haben. Zahlreiche Studien beschrieben eine verstärkte Signalübertragung über die Rezeptortyrosinkinasen PDGF und EGF in allen Gliomgraden (Guha et al. 1995, Hermanson et al. 1992, Jeuken et al. 2007). Auch die vermehrte Expression einzelner relevanter Onkogene des MAP-Kinase-Signalweges wurde in der Vergangenheit gezeigt, so beispielsweise für Ras (Arvanitis et al. 1991, Guha et al. 1997, Orian et al. 1992), Raf-1 (Lyustikman et al. 2008) oder dp-Erk (Mandell et al. 1998). Mutationen der entsprechenden Onkogene wurden bisher nur selten beschrieben (Basto et al. 2005, Hagemann et al. 2009). Der genaue Aktivierungsweg der MAP-Kinase-Kaskade in Gliomen, sowie eine Bestätigung der Progressionsrelevanz sollte somit als Ziel künftiger Studien weiter verfolgt werden.

### **5.3.2. Der PI3K-/Akt-Signalweg nimmt Anteil an der Pathogenese mancher, aber nicht aller Gliome**

In den 1980er Jahren zeigten zytogenetische Analysen spezifische chromosomale Veränderungen bei Leukämien, Lymphomen und verschiedenen soliden Tumoren, was einen enormen Fortschritt für Diagnostik und Therapie mit sich brachte. Es folgte die Ausweitung der zytogenetischen Studien auf weitere solide Tumore. Im Jahr 1984 beschrieben Bigner und Kollegen nebenbefundlich in einer Studie zur Untersuchung chromosomaler Veränderungen maligner Hirntumoren einen Verlust von Chromosom 10 (Bigner et al. 1984). Der Verlust des Chromosoms besonders in

malignen Gliomen wurde in den folgenden Jahren durch multiple Studien bestätigt (Fults et al. 1992, Watanabe et al. 1990). Im Jahr 1997 beschrieben Li et al. erstmals die Existenz eines Tumorsuppressorproteins auf Chromosom 10 und nannten es „Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome Ten“ (PTEN) (Li et al. 1997). Im weiteren Verlauf kam es zur Entschlüsselung der Bedeutung des Tumorsuppressors für den PI3K-/Akt-Signalweg (Maehama und Dixon 1998), sodass die Signalkaskade in den Fokus verschiedener Gliomstudien geriet. Sonoda et al. belegten 2001 die Bedeutung des Signalwegs für die Progression von anaplastischen Astrozytomen zu Glioblastomen am Mausmodell (Sonoda et al. 2001a). Es folgte die erste Aufschlüsselung des Signalweges in Glioblastomen in vivo durch immunhistochemische Studien von Choe et al. im Jahr 2003. Sie zeigten, dass eine Aktivierung von Akt signifikant mit der Aktivierung seines nachgestellten Effektors, sowie invers mit dem Verlust von PTEN korrelieren (Choe et al. 2003). Weitere immunhistochemische Studien folgten: Wang et al. betrachteten im Jahr 2004 128 infiltrierende Gliome der WHO Grade II-IV hinsichtlich ihres Akt-Aktivierungsstatus und wiesen sowohl eine steigende Akt-Phosphorylierung mit steigendem Malignitätsgrad als auch die zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation von pAkt nach (Wang et al. 2004). Die strenge Korrelation von pAkt bzw. phospho-mTor mit dem histologischen Grad bestätigten auch Mizoguchi et al. 2006 und Annovazzi et al. 2009 (Annovazzi et al. 2009, Mizoguchi et al. 2006). Auch die Expression von pAkt in pilozytischen Astrozytomen wurde im Rahmen immunhistochemischer Studien betrachtet: Rodriguez et al. beschrieben im Jahr 2011 einen schrittweisen Anstieg der pAkt-Expression mit steigender Aggressivität der WHO-Grad I-Gliome (Rodriguez et al. 2011).

Um die Bedeutung des PI3K-/Akt-Signalweges in Gliomen zu bestätigen führten wir in unserer Studie eine immunhistochemische Untersuchung der relevanten Moleküle der Signalkaskade durch und betrachteten dabei die Expression der Protein-Kinase Akt, seinem nachgestellten Effektor mTor und dessen aktiver Form phospho-mTor. Dabei zeigten die untersuchten Gliome nach Akt-Antikörperfärbung nur eine sehr schwache Farbreaktion, die weniger als zehn Prozent des Zytoplasmas der Präparate einnahm. In einem anaplastischen Astrozytom konnte eine Kernfärbung nachgewiesen werden. Auch die Farbstärke nach Antikörperfärbung war sehr schwach: Die pilozytischen Astrozytome zeigten eine zu vernachlässigende Farbreaktion, die infil-

trierenden Gliome eine insgesamt nur schwache Farbintensität. Insgesamt war somit die Akt-Expression in Gliomen nicht bis nur schwach ausgeprägt. Für die infiltrierenden Gliome stellte sich die Tendenz einer verstärkten Expression in anaplastischen im Vergleich zu diffusen Astrozytomen dar. Diese war für Glioblastome bereits wieder rückläufig und ist aufgrund der minimalen Expressionsunterschiede zwischen den Gliomgraden zu vernachlässigen. Auch statistisch ergab sich weder mittels  $\chi^2$ , noch mittels Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von Akt und dem Gliomgrad.

Die im Anschluss untersuchte mTor-Protein-Kinase zeigte eine höhere Expressionsrate. Nach Färbung mit dem entsprechenden Antikörper waren durchschnittlich 60 Prozent des Zytoplasmas der betrachteten Schnittpräparate gefärbt. Eine Kernfärbung trat nicht auf. Die Farbintensität stellte sich insgesamt in einem Farbstärkebereich von mittel bis stark dar, sodass sowohl für die pilozytischen als auch für die infiltrierenden Gliomen auf eine deutliche Expression von mTor geschlossen werden konnte. Es zeigte sich für die infiltrierenden Gliome eine leichte Tendenz hin zu einer mit steigendem WHO-Grad verstärkten Expression. Dieser Expressionsanstieg stellte sich insgesamt nur sehr schwach dar. Desweiteren trat bereits in niedrigen Gliomgraden eine starke mTor-Expression auf, sodass der Zusammenhang zwischen Progression und histologischem Grad durch unsere Studien nicht bestätigt werden konnte. Auch statistisch ließ sich mittels  $\chi^2$ -Test und Kruskal-Wallis-Test kein Zusammenhang zwischen Malignitätsgrad und mTor-Expression sichern.

Auch die aktivierte Form von mTor, phospho-mTor, war in den betrachteten Gliomen exprimiert. Die mit Anti-phospho-mTor-Antikörper zu beobachtende Färbung war ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert, nahm etwa 55 Prozent der Präparate ein und zeigte insgesamt eine schwächere Intensität als die Färbung mit Anti-mTor-Antikörper. Die von den Gliomen gezeigte Expression von phospho-mTor stellte sich dabei mit der Lokalisation und Ausdehnung der Gesamt-mTor-Level vergleichbar dar. Insgesamt ist die Expression aber schwächer. Es zeigt sich auch für phospho-mTor eine steigende Expressionstendenz mit zunehmendem histologischem Grad. Diese ist wiederum nur minimal und nicht statistisch signifikant zu belegen.

Insgesamt betrachtet, zeigen sich für den PI3K-/Akt-Signalweg aus unserer Studie teilweise widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich zu vorangegangenen Studien. Für die Protein-Kinase Akt konnten wir für pilozytische Astrozytome keine, für

infiltrierende Astrozytome nur eine sehr schwache Expression ohne eindeutige Progressionstendenz nachweisen. Dies widerspricht der von zahlreichen Autoren beschriebenen Progressionsrelevanz von aktiviertem Akt (Annovazzi et al. 2009, Mizoguchi et al. 2006, Wang et al. 2004). Nun wurde in der aktuellen Studie nicht die Akt-Aktivierung, sondern die Expression der Protein-Gesamtlevel betrachtet. Man kann also festhalten, dass zahlreiche Autoren eine verstärkte Aktivierung von Akt mit steigendem Gliomgrad beschrieben und damit die Progressionsrelevanz des PI3K-/Akt-Signalweges in Gliomen belegten, dass dabei die Akt-Gesamtlevel jedoch weder in pilozytischen noch in infiltrierenden Gliomen erhöht sind. Die Aktivierung von Akt ist damit wahrscheinlich unabhängig von einer Vermehrung der Gesamtlevel. Bestätigen konnten wir in unserer Studie die vereinzelt auftretende nukleäre Lokalisation von Akt, die bereits von Wang et al. und Annovazzi et al. beschrieben wurde (Annovazzi et al. 2009, Wang et al. 2004). Auch die Translokation von Akt in den Zellkern spielt in Gliomen also eine Rolle, die es in weiterführenden Studien zu eruieren gilt.

Der Akt nachgestellte Effektor mTor und seine aktivierte Form phospho-mTor zeigten in Gliomen im Gegensatz zu Akt eine deutliche Expression. Die mTor-Gesamt-Level waren insgesamt etwas stärker als die Expression der aktivierten Form, zeigten aber eine ähnliche Lokalisation und Expressionstendenz. Es wird somit die verstärkte Expression von mTor und die daraus folgende Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweges in Gliomen deutlich. Unsere Ergebnisse bestätigten mittels einer starken Expression von mTor und phospho-mTor die bereits von Rodriguez et al. beschriebene Aktivierung des Signalweges in pilozytischen Astrozytomen. Zusammen mit dem MAP-Kinase-Signalweg scheint die PI3K-/Akt-Kaskade die biologische Aggressivität pilozytischer Astrozytome zu bestimmen (Rodriguez et al. 2011). Insgesamt war die Expression beider Proteine auch in niedriggradigen infiltrierenden Gliomen sehr ausgeprägt und zeigte einen Anstieg mit dem WHO-Grad. Der Expressionsunterschied zwischen den WHO-Graden war dabei nur minimal und ließ sich statistisch nicht sichern, sodass für die infiltrierenden Gliome von einer einheitlich starken Expression von mTor und phospho-mTor gesprochen werden kann. Dies entspricht nicht den Ergebnissen anderer Studien, die eine verstärkte Expression von phospho-mTor mit steigendem histologischem Grad beschrieben (Annovazzi et al. 2009). Li et al. berichteten in ihrer Studie im Jahr 2011 von ähnlichen Ergebnissen: Sie zeigten in der immunhistochemischen Untersuchung eine starke Expressionsrate

von phospho-mTor, die auf den ersten Blick mit steigendem WHO-Grad zuzunehmen schien. Insgesamt stellte sich in ihrer Studie jedoch eine variable Expression von phospho-mTor in den untersuchten Gliomen dar, einige Schnittpräparate blieben wie auch in unserem Fall gänzlich ungefärbt. In Zusammenschau unserer Studienresultate und den Ergebnissen von Li et al. 2011 halten wir also fest, dass die Aktivierung des PI3K-/Akt-Signalweg in infiltrierenden Gliomen sehr variabel ist und der Signalweg an der Pathogenese mancher, aber nicht aller Gliome Anteil nimmt (Li et al. 2011).

## **6. Schlussfolgerung**

Zur Untersuchung der Rolle des MAP-Kinase- und PI3K-/Akt-Signalweges in primären Hirntumoren wurde in der vorliegenden Arbeit mittels immunhistochemischer Untersuchungen die Expression relevanter Schlüsselmoleküle der Signalkaskaden betrachtet und deren Beziehung zum jeweiligen Malignitätsgrad der Tumore dargestellt.

Aus den Untersuchungen unserer Studie ergab sich in Meningeomen für den MAP-Kinase-Signalweg eine Initiations- und für den PI3K-/Akt-Signalweg eine mögliche Progressionsrelevanz mit einer vermehrten Aktivierung der betrachteten Proteine unter Verminderung der Gesamtlevel. Die Relevanz beider Signalwege für pilozytische Astrozytome, die bereits in anderen Studien beschrieben wurde, konnte durch die Expression der relevanten Signalproteine in den WHO Grad I-Gliomen belegt werden. Für den MAP-Kinase-Signalweg in infiltrierenden Gliomen der WHO Grade II bis IV ergaben sich Hinweise auf eine Progressionsrelevanz. Auch die relevanten Moleküle des PI3K-/Akt-Signalweges waren in infiltrierenden Gliomen exprimiert, es zeigten sich jedoch auch ungefärbte Präparate, sodass für die Signalkaskade eine Rolle in der Pathobiologie mancher, aber nicht aller Gliome abgeleitet werden kann. Man kann somit festhalten, dass beide Signalwege in primären Hirntumoren eine essentielle Rolle spielen. Es zeigen sich für beide Signalwege in den verschiedenen Tumortypen Tendenzen hinsichtlich Initiations- und Progressionsrelevanz, eine Verallgemeinerung dieser Tendenzen lässt sich jedoch nicht treffen. Um die erhobenen Ergebnisse auch statistisch zu sichern, gilt es diese in weiterführenden Studien anhand größerer Tumormengen zu eruieren und zu bestätigen.

Die immunhistochemische Betrachtung der Expression relevanter Moleküle des MAP-Kinase- und PI3K-/Akt-Signalweges stellt eine gute Möglichkeit der Beurteilung der Rolle beider Signalwege in primären Hirntumoren dar. Das Untersuchungsverfahren bedarf in Zukunft der Einführung einheitlicher Standards hinsichtlich Durchführung und Auswertung. Ist dies gewährleistet könnten sich aus der immunhistochemischen Betrachtung intraoperativ gewonnener Tumorproben neue diagnostische Möglichkeiten zur Klassifizierung primärer Hirntumore ergeben. Die in klinischen Studien ermittelten genetischen Signaturen dienen der künftigen Entwicklung neuer Kontrollen und Standards, um die Diagnostik an kleineren Biopsieproben zu ermöglichen (Choe et al. 2003).

Aus den gewonnenen Erkenntnissen zur Relevanz beider Signalwege in primären Hirntumoren, die es in weiterführenden Studien zu vertiefen gilt, könnte eine Anpassung der Grading-Systeme unter Einbeziehung der molekularen Ausstattung für Hirntumoren resultieren. Dem entsprechend könnte es künftig zu einer gezielten Therapie in Anpassung an die molekulare Grundausstattung der Tumore kommen. Diese wird bereits für verschiedene Inhibitoren des MAP-Kinase- und PI3K-Signalweges in klinischen Studien getestet. Desweiteren zeigte unsere Studie die Relevanz des PI3K-/Akt-Signalweges in manchen, aber nicht allen malignen Gliomen. Entsprechend diesem Wissen könnte sich aus der Entwicklung einer Screeningmethode auf molekulare Veränderungen in den Tumoren eine gezieltere Therapiemöglichkeit ergeben. Das verbesserte Verständnis komplexer Signalwege liefert den Grundstein für verbesserte molekulare Targeted-Therapy-Strategien in malignen Hirntumoren, die auch in den kommenden Jahren weiterhin Mittelpunkt neuroonkologischer Forschungen sein wird.

## Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abraham RT, Gibbons JJ. 2007. The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 13 (11):3109-3114.
- Akhavan D, Cloughesy TF, Mischel PS. 2010. mTOR signaling in glioblastoma: lessons learned from bench to bedside. *Neuro Oncol*, 12 (8):882-889.
- Annovazzi L, Mellai M, Caldera V, Valente G, Tessitore L, Schiffer D. 2009. mTOR, S6 and AKT expression in relation to proliferation and apoptosis/autophagy in glioma. *Anticancer Res*, 29 (8):3087-3094.
- Arvanitis D, Malliri A, Antoniou D, Linardopoulos S, Field JK, Spandidos DA. 1991. Ras p21 expression in brain tumors: elevated expression in malignant astrocytomas and glioblastomas multiforme. *In Vivo*, 5 (4):317-321.
- Bandhakavi S, Kim YM, Ro SH, Xie H, Onsongo G, Jun CB, Kim DH, Griffin TJ. 2010. Quantitative nuclear proteomics identifies mTOR regulation of DNA damage response. *Mol Cell Proteomics*, 9 (2):403-414.
- Bar EE, Lin A, Tihan T, Burger PC, Eberhart CG. 2008. Frequent Gains at Chromosome 7q34 Involving BRAF in Pilocytic Astrocytoma. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Vol. 67, No. 9:878-887.
- Basto D, Trovisco V, Lopes JM, Martins A, Pardal F, Soares P, Reis RM. 2005. Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas. *Acta Neuropathol*, 109 (2):207-210.
- Bigner SH, Mark J, Mahaley MS, Bigner DD. 1984. Patterns of the early, gross chromosomal changes in malignant human gliomas. *Hereditas*, 101 (1):103-113.
- Blenis J. 2002. G-Protein-Coupled Receptors Signaling to MAPK/Erk Cell Signaling Technology, Inc.
- Blenis J. 2003. MAPK/Erk in Growth and Differentiation Danvers: Cell Signaling Technology, Inc. .
- Cheng Y, Pang JC, Ng HK, Ding M, Zhang SF, Zheng J, Liu DG, Poon WS. 2000. Pilocytic astrocytomas do not show most of the genetic changes commonly seen in diffuse astrocytomas. *Histopathology*, 37 (5):437-444.
- Choe G, Horvath S, Cloughesy TF, Crosby K, Seligson D, Palotie A, Inge L, Smith BL, Sawyers CL, Mischel PS. 2003. Analysis of the phosphatidylinositol 3'-kinase signaling pathway in glioblastoma patients in vivo. *Cancer Res*, 63 (11):2742-2746.
- Ding H, Roncari L, Shannon P, Wu X, Lau N, Karaskova J, Gutmann DH, Squire JA, Nagy A, Guha A. 2001. Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res*, 61 (9):3826-3836.
- Dunn GP, Rinne ML, Wykosky J, Genovese G, Quayle SN, Dunn IF, Agarwalla PK, Chheda MG, Campos B, Wang A, Brennan C, Ligon KL, Furnari F, Cavenee WK, Depinho RA, Chin L, Hahn WC. 2012. Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. *Genes Dev*, 26 (8):756-784.
- Feldkamp MM, Lala P, Lau N, Roncari L, Guha A. 1999. Expression of activated epidermal growth factor receptors, Ras-guanosine triphosphate, and mitogen-activated protein kinase in human glioblastoma multiforme specimens. *Neurosurgery*, 45 (6):1442-1453.



- Fults D, Brockmeyer D, Tullous MW, Pedone CA, Cawthon RM. 1992. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression. *Cancer Res*, 52 (3):674-679.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev*, 21 (21):2683-2710.
- Gomori E, Doczi T, Pajor L, Matolcsy A. 1999. Sporadic p53 mutations and absence of ras mutations in glioblastomas. *Acta Neurochir (Wien)*, 141 (6):593-599.
- Guha A, Dashner K, Black PM, Wagner JA, Stiles CD. 1995. Expression of PDGF and PDGF receptors in human astrocytoma operation specimens supports the existence of an autocrine loop. *Int J Cancer*, 60 (2):168-173.
- Guha A, Feldkamp MM, Lau N, Boss G, Pawson A. 1997. Proliferation of human malignant astrocytomas is dependent on Ras activation. *Oncogene*, 15 (23):2755-2765.
- Gursel DB, Connell-Albert YS, Tuskan RG, Anastassiadis T, Walrath JC, Hawes JJ, Amlin-Van Schaick JC, Reilly KM. 2011. Control of proliferation in astrocytoma cells by the receptor tyrosine kinase/PI3K/AKT signaling axis and the use of PI-103 and TCN as potential anti-astrocytoma therapies. *Neuro Oncol*, 13 (6):610-621.
- Hagemann C, Gloger J, Anacker J, Said HM, Gerngras S, Kuhnel S, Meyer C, Rapp UR, Kammerer U, Vordermark D, Flentje M, Roosen K, Vince GH. 2009. RAF expression in human astrocytic tumors. *Int J Mol Med*, 23 (1):17-31.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell Press*, 100:57-70.
- Hay N, Sonenberg N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 18 (16):1926-1945.
- Hermanson M, Funa K, Hartman M, Claesson-Welsh L, Heldin CH, Westermark B, Nister M. 1992. Platelet-derived growth factor and its receptors in human glioma tissue: expression of messenger RNA and protein suggests the presence of autocrine and paracrine loops. *Cancer Res*, 52 (11):3213-3219.
- Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet*, 25 (1):55-57.
- Hu X, Pandolfi PP, Li Y, Koutcher JA, Rosenblum M, Holland EC. 2005. mTOR Promotes Survival and Astrocytic Characteristics Induced by Pten/Akt Signaling in Glioblastoma. *Neoplasia*, 7 (4):356-368.
- Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 2000. Gene expression profiling of low-grade diffuse astrocytomas by cDNA arrays. *Cancer Res*, 60 (24):6868-6874.
- James MF, Han S, Polizzano C, Plotkin SR, Manning BD, Stemmer-Rachamimov AO, Gusella JF, Ramesh V. 2009. NF2/merlin is a novel negative regulator of mTOR complex 1, and activation of mTORC1 is associated with meningioma and schwannoma growth. *Mol Cell Biol*, 29 (15):4250-4261.
- Janzarik WG, Kratz CP, Loges NT, Olbrich H, Klein C, Schafer T, Scheurlen W, Roggendorf W, Weiller C, Niemeyer C, Korinthenberg R, Pfister S, Omran H. 2007. Further evidence for a somatic KRAS mutation in a pilocytic astrocytoma. *Neuropediatrics*, 38 (2):61-63.
- Jentoft M, Giannini C, Cen L, Scheithauer BW, Hoesley B, Sarkaria JN, Abell-Aleff PC, Rodriguez EF, Li Y, Rodriguez FJ. 2011. Phenotypic variations in NF1-associated low grade astrocytomas- possible role for increased mTOR activation in a subset. *Int J Clin Exp Pathol*:43-57.

- Jeuken J, van den Broecke C, Gijsen S, Boots-Sprenger S, Wesseling P. 2007. RAS/RAF pathway activation in gliomas: the result of copy number gains rather than activating mutations. *Acta Neuropathol*, 114 (2):121-133.
- Johnson MD, Woodard A, Kim P, Frexes-Steed M. 2001. Evidence for mitogen-associated protein kinase activation and transduction of mitogenic signals by platelet-derived growth factor in human meningioma cells. *Journal of Neurosurgery*, 94:293–300.
- Johnson MD, O'Connell M, Vito F, Bakos RS. 2009. Increased STAT-3 and synchronous activation of Raf-1-MEK-1-MAPK, and phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt-mTOR pathways in atypical and anaplastic meningiomas. *J Neurooncol*, 92 (2):129-136.
- Johnson MD, Okediji E, Woodard A, Toms SA, Allen GS. 2002. Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase–Akt–p70S6K pathway activation and transduction of mitogenic signals by platelet-derived growth factor in meningioma cells. *Journal of Neurosurgery*, 97:668–675.
- Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Ichimura K, Collins VP. 2009. Oncogenic RAF1 rearrangement and a novel BRAF mutation as alternatives to KIAA1549:BRAF fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma. *Oncogene*, 28 (20):2119-2123.
- Jones DT, Kocialkowski S, Liu L, Pearson DM, Backlund LM, Ichimura K, Collins VP. 2008. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res*, 68 (21):8673-8677.
- Kapoor GS, O'Rourke DM. 2003. Receptor Tyrosine Kinase Signaling in Gliomagenesis. *Landes Bioscience*:330-342.
- Kapoor GS, O'Rourke DM. 2003. Mitogenic Signaling Cascades in Glial Tumors. *Neurosurgery*, 52 (6):1425-1435.
- Kim YH, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, Wrede K, Nakazato Y, Tanaka Y, Vital A, Mariani L, Stawski R, Watanabe T, De Girolami U, Kleihues P, Ohgaki H. 2010. Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. *Am J Pathol*, 177 (6):2708-2714.
- Kita D, Yonekawa Y, Weller M, Ohgaki H. 2007. PIK3CA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol*, 113 (3):295-302.
- Kleihues P, Ohgaki H. 1999. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro Oncol*, 1 (1):44-51.
- Knobbe CB, Merlo A, Reifenberger G. 2002. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol*, 4 (3):196-211.
- Korshunov A, Meyer J, Capper D, Christians A, Remke M, Witt H, Pfister S, von Deimling A, Hartmann C. 2009. Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathol*, 118 (3):401-405.
- Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. 1994. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg*, 81 (3):427-436.
- Lau N, Feldkamp MM, Roncari L, Loehr AH, Shannon P, Gutmann DH, Guha A. 2000. Loss of neurofibromin is associated with activation of RAS/MAPK and PI3-K/AKT signaling in a neurofibromatosis 1 astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59 (9):759-767.
- Leong AS. 2004. Pitfalls in diagnostic immunohistology. *Adv Anat Pathol*, 11 (2):86-93.
- Leong TY, Cooper K, Leong AS. 2010. Immunohistology--past, present, and future. *Adv Anat Pathol*, 17 (6):404-418.

- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliaresis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. 1997. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*, 275 (5308):1943-1947.
- Li XY, Zhang LQ, Zhang XG, Li X, Ren YB, Ma XY, Li XG, Wang LX. 2011. Association between AKT/mTOR signalling pathway and malignancy grade of human gliomas. *J Neurooncol*, 103 (3):453-458.
- Löffler G, Petrides PE. 2002. *Biochemie&Pathobiochemie*. 7. Aufl. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
- Louis DN. 1994. The p53 gene and protein in human brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, 53 (1):11-21.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol*, 114:97-109.
- Lyustikman Y, Momota H, Pao W, Holland EC. 2008. Constitutive Activation of Raf-1 Induces Glioma Formation in Mice. *Neoplasia*, 10:501-510.
- Maehama T, Dixon JE. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 273 (22):13375-13378.
- Maltzman TH, Mueller BA, Schroeder J, Rutledge JC, Patterson K, Preston-Martin S, Faustman EM. 1997. Ras oncogene mutations in childhood brain tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6 (4):239-243.
- Mandell JW, Hussaini IM, Zecevic M, Weber MJ, VandenBerg SR. 1998. In situ visualization of intratumor growth factor signaling: immunohistochemical localization of activated ERK/MAP kinase in glial neoplasms. *Am J Pathol*, 153 (5):1411-1423.
- Martelli AM, Tabellini G, Bressanin D, Ognibene A, Goto K, Cocco L, Evangelisti C. 2012. The emerging multiple roles of nuclear Akt. *Biochim Biophys Acta*, 1823 (12):2168-2178.
- Mawrin C, Sasse T, Kirches E, Kropf S, Schneider T, Grimm C, Pambor C, Vorwerk CK, Firsching R, Lendeckel U, Dietzmann K. 2005. Different Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase and Akt Signaling Is Associated with Aggressive Phenotype of Human Meningiomas. *Clinical Cancer Research* 11/2005:4074-4082.
- McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1773 (8):1263-1284.
- Mizoguchi M, Betensky RA, Batchelor TT, Bernay DC, Louis DN, Nutt CL. 2006. Activation of STAT3, MAPK, and AKT in malignant astrocytic gliomas: correlation with EGFR status, tumor grade, and survival. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65 (12):1181-1188.
- Müller-Esterl W, Brandt U, Anderka O, Kieß S, Ridinger K, Plenikowski M. 2004. *Biochemie- Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 1. Aufl. München: Elsevier GmbH.
- Ohgaki H, Kleihues P. 2007. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol*, 170 (5):1445-1453.

- Orian JM, Vasilopoulos K, Yoshida S, Kaye AH, Chow CW, Gonzales MF. 1992. Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. *Br J Cancer*, 66 (1):106-112.
- Osterwalder E. 2009. Immunhistochemie kompakt. Einführung in die wichtigsten Grundlagen zu Theorie und Praxis [Skript].
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Jr., Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, 321 (5897):1807-1812.
- Perry A, Gutmann DH, Reifenberger G. 2004. Molecular pathogenesis of meningiomas. *Journal of Neuro-Oncology*, 70:183–202.
- Peters N, Wellenreuther R, Rollbrocker B, Hayashi Y, Meyer-Puttlitz B, Duerr EM, Lenartz D, Marsh DJ, Schramm J, Wiestler OD, Parsons R, Eng C, von Deimling A. 1998. Analysis of the PTEN gene in human meningiomas. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 24 (1):3-8.
- Pfister S, Janzarik WG, Remke M, Ernst A, Werft W, Becker N, Toedt G, Wittmann A, Kratz C, Olbrich H, Ahmadi R, Thieme B, Joos S, Radlwimmer B, Kulozik A, Pietsch T, Herold-Mende C, Gnekow A, Reifenberger G, Korshunov A, Scheurlen W, Omran H, Lichter P. 2008. BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *J Clin Invest*, 118 (5):1739-1749.
- Ragel BT, Jensen RL. 2010. Aberrant signaling pathways in meningiomas. *J Neurooncol*, 99 (3):315-324.
- Reifenberger G, Collins VP. 2004. Pathology and molecular genetics of astrocytic gliomas. *J Mol Med (Berl)*, 82 (10):656-670.
- Reifenberger J, Ring GU, Gies U, Cobbers L, Oberstrass J, An HX, Niederacher D, Wechsler W, Reifenberger G. 1996. Analysis of p53 mutation and epidermal growth factor receptor amplification in recurrent gliomas with malignant progression. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55 (7):822-831.
- Riede U-N, Werner M, Schaefer H-E. 2004. Allgemeine und spezielle Pathologie. 5 Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Riemenschneider MJ, Perry A, Reifenberger G. 2006. Histological classification and molecular genetics of meningiomas. *The Lancet Neurology*, 5 (12):1045-1054.
- Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G. 2010. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol*, 120 (5):567-584.
- Rodriguez EF, Scheithauer BW, Giannini C, Ryneerson A, Cen L, Hoesley B, Gilmer-Flynn H, Sarkaria JN, Jenkins S, Long J, Rodriguez FJ. 2011. PI3K/AKT pathway alterations are associated with clinically aggressive and histologically anaplastic subsets of pilocytic astrocytoma. *Acta Neuropathol*, 121 (3):407-420.
- Roessner A, Pfeifer U, Müller-Hermelink HK. 2008. Grundmann: Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie. 11 Aufl. München: Elsevier GmbH.
- Scheid M. 2007. PI3K / Akt Signaling Cell Signaling Technology, Inc. .
- Shapiro JR. 2002. Genetic alterations associated with adult diffuse astrocytic tumors. *Am J Med Genet*, 115 (3):194-201.

- Sharma MK, Zehnbauer BA, Watson MA, Gutmann DH. 2005. RAS pathway activation and an oncogenic RAS mutation in sporadic pilocytic astrocytoma. *Neurology*, 65 (8):1335-1336.
- Silbernagl S, Lang F. 2009. Taschenatlas Pathophysiologie. 3. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Simon M, Bostrom JP, Hartmann C. 2007. Molecular genetics of meningiomas: from basic research to potential clinical applications. *Neurosurgery*, 60 (5):787-798; discussion 787-798.
- Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO. 2001a. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res*, 61 (18):6674-6678.
- Sonoda Y, Ozawa T, Hirose Y, Aldape KD, McMahon M, Berger MS, Pieper RO. 2001b. Formation of intracranial tumors by genetically modified human astrocytes defines four pathways critical in the development of human anaplastic astrocytoma. *Cancer Res*, 61 (13):4956-4960.
- Sunayama J, Matsuda K, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitano C. 2010. Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Stem Cells*, 28 (11):1930-1939.
- Thoreen C, Sabatini D. 2008. mTOR Signaling Danvers: Cell Signaling Technology, Inc.
- Todo T, Adams EF, Fahlbusch R, Dingermann T, Werner H. 1996. Autocrine growth stimulation of human meningioma cells by platelet-derived growth factor. *J Neurosurg*, 84 (5):852-858; discussion 858-859.
- Tohma Y, Gratas C, Biernat W, Peraud A, Fukuda M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 1998. PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 57 (7):684-689.
- Vazquez-Martin A, Cufí S, Oliveras-Ferraros C, Menendez JA. 2011. Raptor, a positive regulatory subunit of mTOR complex 1, is a novel phosphoprotein of the rDNA transcription machinery in nucleoli and chromosomal nucleolus organizer regions (NORs). *Cell Cycle*, 10 (18):3140-3152.
- Velpula KK, Rehman AA, Chelluboina B, Dasari VR, Gondi CS, Rao JS, Veeravalli KK. 2012. Glioma stem cell invasion through regulation of the interconnected ERK, integrin alpha6 and N-cadherin signaling pathway. *Cell Signal*, 24 (11):2076-2084.
- Wang H, Zhang W, Huang HJ, Liao WS, Fuller GN. 2004. Analysis of the activation status of Akt, NFkappaB, and Stat3 in human diffuse gliomas. *Lab Invest*, 84 (8):941-951.
- Wang JL, Nister M, Hermansson M, Westermarck B, Ponten J. 1990. Expression of PDGF beta-receptors in human meningioma cells. *Int J Cancer*, 46 (5):772-778.
- Watanabe K, Nagai M, Wakai S, Arai T, Kawashima K. 1990. Loss of constitutional heterozygosity in chromosome 10 in human glioblastoma. *Acta Neuropathol*, 80 (3):251-254.
- Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 1996. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol*, 6 (3):217-223; discussion 223-214.

- Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 1997. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res*, 3 (4):523-530.
- Wong ML, Kaye AH, Hovens CM. 2007. Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes. *J Clin Neurosci*, 14 (4):301-308.
- Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124 (3):471-484.
- Zhu Y, Parada LF. 2002. The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer*, 2 (8):616-626.

## **Danksagung**

Zu Beginn möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Rolf Kalff für die Bereitstellung dieses Promotionsthema und die Möglichkeit der Bearbeitung an der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Jena bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. med. habil. Jan Walter und und Priv.-Doz. Dr. med. habil. Christian Ewald für die unterstützende Betreuung und dass sie mir, wann immer es nötig und möglich war, mit Rat und Tat zur Seite standen.

Desweiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Dr. rer. nat. Susanne Grube und Dipl.-Biol. Diana Freitag bedanken, die mich während meiner experimentellen Forschungsarbeit stets geduldig und mit vielen konstruktiven Vorschlägen unterstützt haben.

Ferner gilt mein Dank dem Institut für Neuropathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin für die Bereitstellung der Tumorgewebeschnitte und -proben, sowie Dr.-Ing. Heike Hoyer für die hilfreichen Anregungen und die Beratung bei der statistischen Auswertung.

Schließlich bedanke ich mich bei meiner Familie, die mir in jeder Situation einen starken Rückhalt geben und immer an mich glauben.

Vielen Dank!

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Priv.-Doz. Dr. med. habil. Jan Walter

Dr. rer. nat. Susanne Grube

Dipl.-Biol. Diana Freitag,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 21.10.2014

Stephanie May